

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIVIRAL COMBINACIONAL Y  
MECANISMO DE ACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE ALGAS  
MEXICANAS**

**POR**

**M.C. KARLA SELENE MORÁN SANTIBÁÑEZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA**

**JUNIO, 2017**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIVIRAL COMBINACIONAL Y MECANISMO  
DE ACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE ALGAS MEXICANAS**

**Comité de Tesis**

---

**Dra. Laura María Trejo Ávila**  
**Director de la tesis**

---

**Dr. Pablo Zapata Benavides**  
**Secretario**

---

**Dr. José Santos García Alvarado**  
**Vocal**

---

**Dra. Lucía Elizabeth Cruz Suarez**  
**Vocal**

---

**Dr. Denis Ricque Marie**  
**Vocal**

## **ÁREA DE TRABAJO**

Este trabajo fue realizado en la Unidad de Virología y Cáncer del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Laura María Trejo Ávila.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios y por el apoyo económico otorgado a través del proyecto PDCPN2013-215075.

Al Laboratorio de Inmunología y Virología y a la Dra. Cristina Rodríguez Padilla por todas las facilidades para realizar esta investigación.

A la Dra. Laura Trejo Ávila, por despertar en mi el amor a la Virología, por ser mi mentora y amiga a lo largo de los casi 9 años en los que me ha permitido ser parte de su grupo de trabajo, gracias por sus consejos, su paciencia, pero sobre todo, gracias por confiar en mí, por darme la oportunidad de desarrollarme profesionalmente en su laboratorio y por todo el apoyo en los momentos difíciles.

A todos los miembros del Comité de Tesis, por su ayuda, consejo y tutoría al desarrollar este trabajo.

Al Programa de Maricultura de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en especial a la Dra. Elizabeth Cruz por todo el apoyo y ayuda para desarrollar este proyecto de investigación.

A mis compañeros y amigos de la Unidad de Virología y Cáncer y del LIV, con los que he convivido a lo largo de estos años, gracias por su amistad y por todos los momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio, siempre tendrán un lugar en mi corazón. Al LBG Mario Peña Hernández agradezco su apoyo incondicional en la parte experimental de este trabajo, gracias por la ayuda en cada ensayo, extracción y reacción de PCR, agradezco también a la QBP Karen Ledezma por su apoyo en el análisis estadístico de esta investigación. A toda mi familia y amigos, por cada palabra de aliento, gracias por confiar en mí y motivarme en todo momento.

## DEDICATORIA

*A Dios por guiarme en cada paso, permitirme vivir y terminar este proyecto.*

*A mi mamá, María Elba Santibáñez, por su amor infinito y por ser mi motor, te amo y te  
debo todo madre.*

*A mis hermanos Diana y Carlos, por su cariño y apoyo en cada etapa de mi vida, los amo y  
agradezco que nunca hayan dejado de creer en mi.*

*A mi madrina Rosy Santibáñez, por ser mi segunda madre y siempre estar al pendiente de  
mi desarrollo personal y profesional.*

*A mi familia y abuelos por su apoyo y motivación.*

*A todos mis perritos, que son mi familia y que me dan tanto amor y felicidad.*

*A mi esposo Ricardo, por su amor completo, por ser mi más grande inspiración y apoyo.  
¡Gracias por ser la luz de mis días, mi sol y mis estrellas!*

## INDICE DE TABLAS

<b>Título de tabla</b>	<b>Página</b>
Tabla 1. Agentes antivirales aprobados por la FDA y su mecanismo de acción.	5
Tabla 2. Algunos ejemplos de compuestos biológicamente activos de las algas y su efecto.	10
Tabla 3. Actividad antiviral de polisacáridos sulfatados provenientes de algas pardas.	14
Tabla 4. Actividad antiviral de polisacáridos sulfatados provenientes de algas verdes.	17
Tabla 5. Actividad antiviral de polisacáridos sulfatados provenientes de algas rojas.	19
Tabla 6. Efecto citotóxico, actividad antiviral e índice de selectividad de los polisacáridos sulfatados.	53
Tabla 7. Efecto citotóxico, actividad antiviral e índice de selectividad de los polifenoles	53
Tabla 8. Efecto antiviral de las combinaciones de los polisacáridos sulfatados	64
Tabla 9. Efecto antiviral de las combinaciones de los PS y PF	68
Tabla 10. Efecto antiviral de las combinaciones de los PS y la ribavirina	70

## INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Línea del tiempo que muestra la aprobación de fármacos por la FDA contra 9 enfermedades humanas infecciosas	3
Figura 2. Representación esquemática de los productos naturales, su blanco y su espectro antiviral.	7
Figura 3. Estructura química del fucoidan	13
Figura 4. Estructura química de alginatos en bloques GM	15
Figura 5. Estructura química del ulvan	16
Figura 6. Representación esquemática de las unidades que se presentan de manera repetida en los diferentes carragenanos.	18
Figura 7. Estructura de ácidos fenólicos	22
Figura 8. Estructura de flavonoides	23
Figura 9. Representación esquemática del virus de sarampión (a) y su genoma (b)	26
Figura 10. Replicación del virus de sarampión.	31
Figura 11. Estrategias de experimentación llevadas a cabo en este estudio	39
Figura 12. Efecto citotóxico de los polisacáridos sulfatados sobre la viabilidad celular	49
Figura 13. Efecto de los polisacáridos sulfatados obtenidos de las algas <i>Macrocystis pyrifera</i> , <i>Solieria filiformis</i> y <i>Eisenia arborea</i> en la formación de sincicios por MeV.	51
Figura 14. Efecto de los polisacáridos sulfatados obtenidos de las algas <i>Pelvetia compressa</i> y <i>Ulva intestinalis</i> en la formación de sincicios por MeV	52
Figura 15. Confirmación de la actividad antiviral de los PS de <i>Eisenia arborea</i> .	55
Figura 16. Confirmación de la actividad antiviral de los PS de <i>Solieria filiformis</i> .	55
Figura 17. Inhibición de sincicios por los PS de <i>Eisenia arborea</i> y <i>Solieria filiformis</i> en los primeros pasos de la infección por MeV.	57
Figura 18. Inhibición de sincicios por los Polifenoles de <i>Eisenia arborea</i> y <i>Solieria filiformis</i> en los primeros pasos de la infección por MeV.	57
Figura 19. Efecto de los PS de <i>Eisenia arborea</i> y <i>Solieria filiformis</i> en la penetración viral	59

Figura 20. Efecto de los Polifenoles de <i>Eisenia arborea</i> y <i>Solieria filiformis</i> en la penetración viral.	59
Figura 21. Efecto virucida de los PS de <i>Eisenia arborea</i> y <i>Solieria filiformis</i> .	61
Figura 22. Efecto antiviral de las combinaciones de los PS.	62
Figura 23. Efecto sinérgico de las combinaciones de los PS.	63
Figura 24. Confirmación de la actividad antiviral de las combinaciones sinérgicas de los PS por qPCR.	65
Figura 25. Efecto antiviral de las combinaciones de los PS y PF de <i>Eisenia arborea</i> y <i>Solieria filiformis</i> en la infección por MeV.	66
Figura 26. Efecto sinérgico de las combinaciones de los PS y polifenoles.	67
Figura 27. Confirmación de la actividad antiviral de las combinaciones sinérgicas por qPCR.	69
Figura 28. Efecto antiviral de las combinaciones de los PS de <i>Eisenia arborea</i> y <i>Solieria filiformis</i> y la ribavirina en la infección por MeV	70
Figura 29. Efecto sinérgico de las combinaciones de los PS y la ribavirina.	71
Figura 30. Confirmación de la actividad antiviral de las combinaciones sinérgicas por qPCR	72



## LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

3TC	Lamivudina
°C	Centígrados
Mg	Microgramos
μL	Microlitros
Mm	Micrómetros
ABC	Abacavir
ATCC	American Type Culture Collection
AZT	Azidotimidina
CC <sub>50</sub>	Concentración citotóxica 50%
CD46	Cluster de diferenciación 46
CDC	Centro de Control de Enfermedades
cDNA	DNA complementario
CDV	Virus Distemper Canino
CI <sub>25</sub>	Concentración inhibitoria 25%
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria 50%
CI <sub>75</sub>	Concentración inhibitoria 75%
CINVESTAV	Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
Ct	Threshold point o ciclo umbral
d4T	Stavidina
ddC	Zalcitabina
ddI	Didanosina
DENV	Virus del Dengue
D-MEM	Medio Dulbecco's Modified Eagle's
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
ESCRT	Complejo Endosomal Requerido para Transporte
FBS	Suero Fetal Bovino
FDA	Food and Drug Administration

FTC	Emtricitabina
G	Gramos
gB	Glicoproteína B
gC	Glicoproteína C
HAART	Terapia Antirretroviral de Gran Actividad
HBV	Virus de la Hepatitis B
HCMV	Citomegalovirus Humano
HCV	Virus de la Hepatitis C
HIV	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
HN	Hemaglutinina- Neuroaminidasa
HPV	Virus del Papiloma Humano
HSV	Virus del Herpes Simple
IC	Indice Combinacional
IFN	Interferón
IS	Indice de Selectividad
JEV	Virus de la Encefalitis Japonesa
Kb	Kilobases
MeV	Virus del Sarampión
Mg	Miligramos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensajero
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
NDV	Virus de la enfermedad de New Castle
Nm	Nanometros
OMS	Organización Mundial de la Salud
pB	Pares de Bases
PBS	Buffer de Fosfatos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PF	Polifenoles
PFE	Polifenoles de <i>Eisenia</i>

PFS	Polifenoles de <i>Solieria</i>
pH	Potencial de Hidrógeno
PS	Polisacáridos Sulfatados
PSE	Polisacáridos Sulfatados de <i>Eisenia</i>
PSS	Polisacáridos Sulfatados de <i>Solieria</i>
PUFAs	Ácidos grasos poliinsaturados
PVRL4	Receptor relacionado a Poliovirus 4
qPCR	PCR cuantitativa
RdRp	RNA polimerasa dependiente de RNA
RNA	Ácido Ribonucleico
RNP	Ribonucleoproteína
RPM	Revoluciones por Minuto
RSV	Virus respiratorio sincitial
SLAM	Molécula de activación linfocítica de señalización
SFV	Virus Semeliki forest
SPSS	Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales
TCID <sub>50</sub>	Dosis infecciosa en tejidos al 50%
TGF	Factor de crecimiento transformante
UNICEF	Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia
VSV	Virus de la Estomatitis Vesicular
VZV	Virus Varicela Zóster

## RESUMEN

La investigación de antivirales naturales aislados de fuentes marinas es una perspectiva interesante en el desarrollo de nuevos agentes antivirales. Diferentes compuestos químicos han sido aislados de algas, incluyendo polisacáridos y polifenoles, que han sido sometidos a múltiples estudios debido a su extensa variedad de bioactividades, incluyendo su actividad antiviral. Los antivirales facilitan el rápido control de los brotes virales, suprimiendo la enfermedad o reduciendo la severidad de esta; en la actualidad existen muy pocos antivirales en el mercado, y los que existen actúan contra muy limitadas infecciones virales, la mayoría son tóxicos y muy costosos. El efecto sinérgico resultado de la combinación de moléculas antivirales puede reducir las dosis utilizadas en tratamientos, la toxicidad y puede minimizar o retrasar la inducción de resistencia antiviral. El objetivo de esta investigación fue desarrollar nuevos candidatos antivirales a partir de compuestos bioactivos de algas marinas mexicanas. Fueron extraídos polisacáridos sulfatados (PS) y polifenoles (PF) de las algas mexicanas *Macrocystis pyrifera*, *Eisenia arborea*, *Pelvetia compacta*, *Ulva intestinalis* y *Solieria filiformis*. El efecto de los PS y PF sobre la viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de MTT, la actividad antiviral en la infección por el virus de sarampión (MeV) se evaluó mediante ensayos de reducción de sincicios y se confirmó mediante ensayos de qPCR. Se seleccionaron los compuestos con la mejor actividad antiviral con el fin de evaluar su mecanismo de acción y su efecto combinacional. El modo de acción de los compuestos se analizó mediante experimentos de tiempos de adición, penetración viral y ensayos virucidas. El efecto combinacional de los compuestos se calculó por el método de Chou utilizando el software Compusyn. Todos los compuestos probados mostraron actividad antiviral y baja citotoxicidad a concentraciones inhibitorias. La mejor actividad antiviral la exhibieron los PS y PF de *Eisenia arborea* y *Solieria filiformis* (confirmada por qPCR), estos compuestos se seleccionaron para determinar su mecanismo de acción y efecto combinacional entre ellos y con un antiviral comercial (ribavirina). Los ensayos de tiempos de adición y de penetración viral sugieren que los PS de *Eisenia arborea* actúan principalmente inhibiendo la adsorción viral mientras que los PS de *Solieria filiformis* inhiben principalmente la entrada del virus en las células. Los polifenoles de *Eisenia arborea* y *Solieria filiformis* actúan al inactivar las partículas virales (efecto virucida). El efecto sinérgico de las combinaciones se observó al combinar bajas concentraciones de los compuestos, la mejor combinación con el mejor efecto sinérgico e inhibitorio fue la de los PS de *E. arborea* con los PS de *S. filiformis* (0.275 y 0.01 µg/mL, respectivamente), exhibiendo un efecto inhibidor del 96%. Los compuestos bioactivos (polisacáridos sulfatados y polifenoles) de *E. arborea* y *S. filiformis* son candidatos prometedores para el desarrollo de agentes antivirales naturales, las combinaciones sinérgicas encontradas en este estudio ofrecen un potente compuesto antiviral para ser usado en ensayos *in vivo* contra sarampión y posiblemente contra otros virus de la misma familia y/o familias relacionadas.

## ABSTRACT

The investigation of natural antivirals isolated from marine sources is an interesting approach in the development of new antiviral agents. Different chemical compounds have been isolated from algae, including polysaccharides and polyphenols, which have been subjected to multiple studies because of their wide variety of bioactivities, including their antiviral activity. Antivirals facilitate rapid control of viral outbreaks, suppressing the disease or reducing its severity; there are currently very few antivirals on the market, and those that exist act against a very limited number of viral infections; most of them are toxic and very costly. The synergistic effect observed in this study would allow reducing the treatment dose, toxicity, and minimizing or delaying the induction of antiviral resistance. Sulfated polysaccharides (SP) and polyphenols extracted from five Mexican seaweeds (*Macrocystis pyrifera*, *Eisenia arborea*, *Pelvetia compressa*, *Ulva intestinalis* and *Solieria filiformis*) were tested in this study in order to evaluate their effect on Measles virus infection *in vitro*. The aim of this research was to develop new candidates of antiviral drugs that could help to control viral infection diseases. The effect of SPs and polyphenols on cell viability was determined by MTT assay, antiviral activity on MeV infection was evaluated by syncytia reduction assays and was confirmed by qPCR assays. Tested compounds with the best antiviral activity were selected in order to evaluate their mechanism and combined effect. Time of addition experiments, viral penetration and virucidal assays were performed in order to determine the mode of action of SPs and polyphenols. The synergistic effect of compounds was calculated by using Chou method and the Compusyn software. All tested compounds showed antiviral activity, and no cytotoxicity at inhibitory concentrations. SPs and polyphenols from *Eisenia arborea* and *Solieria filiformis* showed the highest antiviral activities (confirmed by qPCR) and were selected to determine their mechanism and combined effect. Time of addition experiments and viral penetration assays suggest that best activities of these SPs occur at different stages of infection. *Eisenia arborea* SPs are acting mainly by inhibiting the viral adsorption whereas *Solieria filiformis* SPs inhibit viral penetration into the cells. On the other hand, *Eisenia arborea* and *Solieria filiformis* polyphenols showed their best effect by inhibiting viral particles (virucidal effect). Synergistic effect was observed at low concentrations, and the best combination with the best synergistic and inhibitory effect was *E. Arborea* SPs with *S. filiformis* SPs (0.275 µg/mL and 0.01 µg/mL, respectively), which exhibited by far a higher inhibitory effect (96% syncytia reduction) in comparison to the individual administration. Bioactive compounds (sulphated polysaccharides and polyphenols) from *E. arborea* and *S. filiformis* are promising candidates for the development of natural antiviral agents; the synergistic combinations found in this study offer a potent antiviral agent to be used in *in vivo* and possibly against other viruses from the same family and/or related families.

# ÍNDICE

<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
<b>ÀREA DE TRABAJO</b>	III
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	IV
<b>DEDICATORIA</b>	V
<b>INDICE DE TABLAS</b>	VI
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	VII
<b>LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS</b>	IX
<b>RESUMEN</b>	XII
<b>ABSTRACT</b>	XIII
<b>1. INTRODUCCION</b>	1
<b>2. ANTECEDENTES</b>	3
2.1 Agentes Antivirales	3
2.1.1 Antivirales de fuentes naturales	6
2.1.2 Algas marinas como fuente de antivirales	7
2.1.2.1 Algas y su clasificación	7
2.1.2.2 Recursos algales mexicanos	8
2.1.2.3 Compuestos biológicamente activos en algas	9
2.1.3 Polisacáridos sulfatados	11
2.1.3.1 Polisacáridos sulfatados de algas pardas	12
2.1.3.2 Polisacáridos sulfatados de algas verdes: Ulván	15
2.1.3.3 Polisacáridos sulfatados de algas rojas: Carragenanos	17
2.1.3.4 Mecanismo de acción antiviral de los Polisacáridos sulfatados	19
2.1.4 Polifenoles	21
2.1.4.1 Clasificación de Polifenoles de acuerdo a su estructura	22
2.1.5 Actividad antiviral de metabolitos secundarios de algas contra	25
Paramixovirus	
2.2 Terapia antiviral combinada	25
2.3 Virus del sarampión	26
2.3.1 Clasificación y características generales.	26
2.3.2 Replicación viral	28

2.3.3 Epidemiología	32
2.3.4 Plan estratégico para la erradicación global de Sarampión	33
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	36
<b>4. HIPÓTESIS</b>	37
<b>5. OBJETIVOS</b>	38
5.1 Objetivo general	38
5.2 Objetivos específicos	38
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	39
6.1 Diseño experimental	39
6.2 Preparación de los extractos	40
6.2.1 Algas mexicanas usadas en el estudio	39
6.2.2 Extracción y purificación de polisacáridos sulfatados.	41
6.2.3 Extracción y purificación de polifenoles.	42
6.3 Evaluación del efecto citotóxico de los compuestos.	42
6.3.1 Cultivo celular	42
6.3.2 Determinación del efecto de los polisacáridos sulfatados sobre la viabilidad celular	42
6.4 Evaluación del efecto antiviral de los compuestos	43
6.4.1 Propagación del virus de Sarampión en células Vero	43
6.4.2 Obtención del título viral por TCID <sub>50</sub>	44
6.4.3 Ensayo de Inhibición de sincicios	44
6.4.4 Confirmación de la actividad antiviral por determinación del título viral por RT-qPCR	45
6.5 Evaluación del nivel de acción de los compuestos	46
6.5.1 Ensayo de Inhibición del Efecto Citopático de los Agentes Antivirales a Diferentes Tiempos de Infección	46
6.5.2 Ensayo de inhibición de la penetración viral	45
6.5.3 Ensayo virucida	46
6.6 Evaluación del efecto sinérgico antiviral de los compuestos seleccionados	47
6.7 Análisis estadístico.	48

<b>7. RESULTADOS</b>	49
7.1 Efecto Citotóxico de los Polisacáridos Sulfatados	49
7.2 Efecto Antiviral de Compuestos de Algas Mexicanas sobre el Virus de Sarampión cepa Edmoston	50
7.2.1 Obtención del Título de de Sarampión cepa Edmoston (MeV) por Dosis Infecciosa en Cultivo de Tejidos al 50% (DICT50)	50
7.2.2 Evaluación del Efecto de los Polisacáridos Sulfatados sobre la Formación de Sincicios Producidos por MeV	50
7.2.3 Selección de los Compuestos de Algas Mexicanas con mejor actividad antiviral	52
7.2.4 Evaluación del Efecto de los Polisacáridos Sulfatados de <i>Eisenia arborea</i> y <i>Solieria filiformis</i> por RT-qPCR	54
7.3 Evaluación del nivel de acción de los compuestos seleccionados	56
7.3.1 Inhibición de Sincicios de los compuestos Diferentes Horas de la Infección	56
7.3.2 Efecto de los compuestos se sobre la Penetración Viral en la Célula Hospedera	58
7.3.3 Evaluación del efecto virucida de los compuestos seleccionados	60
7.4 Evaluación del efecto combinado de los compuestos seleccionados	62
7.4.1 Efecto combinado de PS de <i>Eisenia arborea</i> y <i>Solieria filiformis</i>	61
7.4.2 Efecto combinado de los PS y PF de <i>Eisenia arborea</i> y <i>Solieria filiformis</i>	65
7.4.3 Efecto de los PS de <i>Eisenia arborea</i> y <i>Solieria filiformis</i> en combinación con la ribavirina	69
<b>8. DISCUSIÓN</b>	73
<b>9. CONCLUSIONES</b>	81
<b>10. PERSPECTIVAS</b>	83
<b>11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	84
<b>12. RESUMEN BIOGRÁFICO</b>	94



## INTRODUCCIÓN

América Latina tiene un grupo importante y diverso de especies de algas marinas (O'Dor et al. 2010). Datos recientes sobre el manejo de algas marinas en esta región han descrito las principales cosechas y acuicultura que tienen lugar en Argentina, Brasil, Chile, Perú y México (Rebours et al. 2014). Uno de los objetivos de la explotación de las algas marinas es diversificar su aplicación seleccionando sus diversos compuestos bioactivos, que permanecen inexplorados en las áreas nutracéutica y farmacéutica (Wang et al. 2014).

Diferentes compuestos químicos han sido aislados de algas, incluyendo polisacáridos y polifenoles, que han sido sometidos a una variedad de estudios debido a sus extensas bioactividades y aplicaciones (Ahmadi et al. 2015). La actividad antiviral de estos compuestos se ha demostrado contra numerosos virus envueltos como el virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1) (Mohamed y Agili 2013), virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (Thuy et al. 2015), y diferentes tipos de la familia paramyxoviridae como el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) (Elizondo-Gonzalez et al. 2012) y el virus distemper canino (CDV) (Trejo-Avila et al. 2014).

Los medicamentos antivirales autorizados en los últimos años, han sido aprobados en su mayoría para el tratamiento de las infecciones por el HIV (Antonelli y Turriziani 2012). La investigación de antivirales naturales aislados de fuentes marinas es una interesante opción en el desarrollo de nuevos agentes antivirales.

El virus del sarampión (MeV) pertenece a la familia Paramyxoviridae y es un virus de RNA de cadena negativa causante de una enfermedad altamente contagiosa (Moss y Griffin 2012). Aunque se puede prevenir mediante la vacunación, el sarampión sigue siendo una de las causas de muerte entre los niños de todo el mundo, por lo que una de las metas de la Organización Mundial de la Salud para el 2020 es lograr la eliminación del sarampión y la rubéola como mínimo en cinco regiones de la OMS.

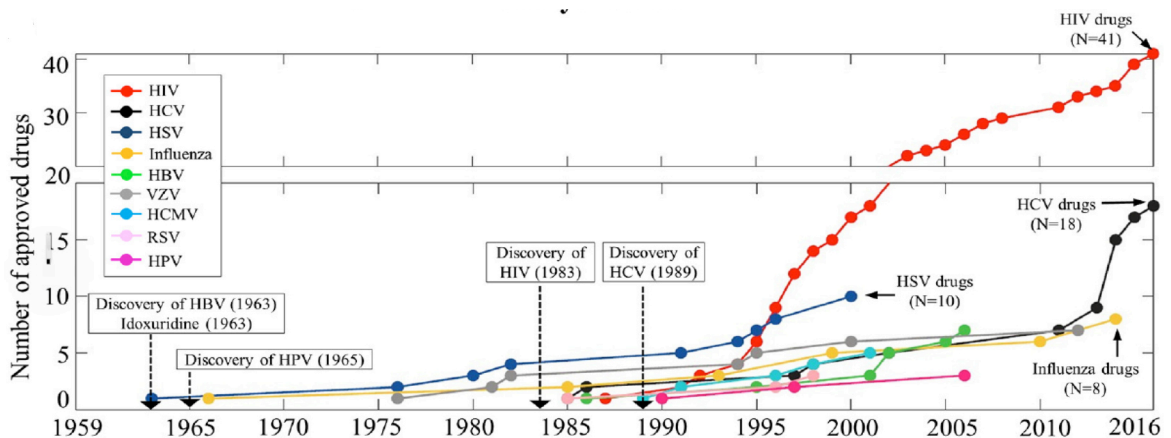
El objetivo de esta investigación fue desarrollar nuevos candidatos de medicamentos antivirales que podrían ayudar a controlar esta infección viral, así como otras infecciones causadas por virus envueltos de importancia médica y veterinaria.

## ANTECEDENTES

### 2.1 Agentes Antivirales

Los agentes antivirales son compuestos que detienen el desarrollo y la propagación de un virus sin causar un daño relevante en la célula huésped. La historia de la terapia antiviral comienza esencialmente en año de 1959 con el uso clínico de la Ixoduridina, un análogo de la timidina capaz de inhibir la replicación del virus del herpes, que posteriormente fue aprobado por la FDA en el año de 1963, sin embargo fue hasta 1977 con el uso del análogo de la guanina Aciclovir que se observó un antiviral con alta selectividad y bajo nivel de citotoxicidad (Lou et al. 2014).

Desde junio de 1963 hasta abril del 2016 se han aprobado formalmente 90 fármacos antivirales para el tratamiento de 9 enfermedades infecciosas humanas; la mayoría de los medicamentos aprobados se han introducido en los últimos 25 años y se utilizan en el tratamiento de la infección por HIV (Figura 1) (Clercq 2016).



**Figura 1.** Línea del tiempo que muestra la aprobación de fármacos por la FDA contra 9 enfermedades humanas infecciosas (HIV, HBV, HCV, VHS, HCMV, HPV, RSV, VZV, y virus de la influenza). El eje de X indica el período comprendido entre enero 1959 a abril 2016, y el eje de Y muestra el número total de medicamentos aprobados. Para cada virus se muestra el número total de medicamentos aprobados. Por otra parte, se observan los años de descubrimiento de algunos virus, HBV (1963), HPV (1965), HIV (1983), y el HCV (1989), mientras que los otros cinco virus fueron descubiertos antes de 1959 (Clercq 2016).

Basándose en sus mecanismos inhibitorios, los antivirales se pueden dividir en dos grupos: Inhibidores de factores virales y moduladores de factores celulares. Los inhibidores de factores virales pueden funcionar directamente o indirectamente para inhibir las funciones biológicas de las proteínas virales (la mayoría con actividades enzimáticas), o bloquear la formación correcta de la maquinaria de replicación viral. Los moduladores de factores celulares se dirigen a las proteínas del huésped que están implicadas en el ciclo de vida viral, la regulación de la función del sistema inmune u otros procesos en la célula huésped. (Tabla 1) (Lou et al. 2014).

**Tabla 1.** Agentes antivirales aprobados por la FDA y su mecanismo de acción.

Mecanismo	Pasos del ciclo viral o función celular modulada	Virus	Tipo de fármaco y nombre
Viral	Entrada	HIV	Inhibidores de la fusión: Enfuvirtide
	Desensamble	Influenza	Unión con la proteína M2: Amantadina y Rimantadina
	Replicación del genoma	HIV	Inhibidores de nucleótidos y nucleósidos: Zidovudine (AZT), didanosina (ddI), zalcitabine (ddC), stavudine (d4T), lamivudine (3TC), abacavir (ABC), emtricitabine (FTC) y tenofovir. Inhibidores no nucleosídicos: Nevirapine, delavirdine, efavirenz, etravirine y rilpivirine
		HBV	Análogos de nucleósidos/nucleótidos: Lamivudine, emtricitabine, entecavir, telbivudine, adefovir y tenofovir.
		HSV y VZV	Análogos de nucleósidos/nucleótidos: Aciclovir, penciclovir, idoxuridine, trifluridine y brivudine
		HCMV	Ganciclovir y cidofovir
	Integración en el genoma del huésped	HIV	Inhibidores de la integrasa: Raltegravir y elvitegravir
	Síntesis de mRNAs virales	HCMV	Oligonucleotido antisentido: Fomivirsen
	Corte de las proteínas virales	HIV	Inhibidores de la proteasa: Saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir and its prodrug fosamprenavir, lopinavir, atazanavir, tipranavir y darunavir.
	Ensamblaje	Influenza	Inhibidores de la neuroaminidasa: Oseltamivir y zanamivir
Celular	Entrada viral	HIV	Inhibidores de correceptores virales: Maraviroc
	Inmunidad innata	HCV y HVB	Interferones: Pegilados $\alpha$ -2a y $\alpha$ -2b, e interferones $\alpha$ -2a y $\alpha$ -2b
	Inhibidores de ciclofilina	HCV	Alisporivir

\*(Lou et al. 2014)

### **2.1.1 Antivirales de fuentes naturales**

Los productos naturales han sido y seguirán siendo una rica fuente de fármacos; en cuanto al desarrollo de agentes antivirales se han hecho contribuciones significativas en este campo, en el año de 1950 cuando se desarrollaron los antivirales análogos de nucleósidos, los primeros prototipos de estos antivirales fueron la espongouridina y la espongotimidina, provenientes de fuentes marinas. Posteriormente se descubrió la arabinosiladenina, comercializada como Vidarabin, de la cual años después de su síntesis química se mostró podría ser obtenida a partir de fuentes naturales. Así también es notable la gran similitud entre la ribavirina, antiviral de amplio espectro y los productos naturales como Pyrazomycina o Showdomycina (Jha y Zi-rong 2004).

Se han descrito muchas sustancias de diversas fuentes naturales; provenientes de bacterias, hongos, plantas y animales que tienen propiedades antivirales (Figura 2) (Martinez et al. 2015).

Debido a su fácil accesibilidad, las plantas terrestres han servido como la principal fuente de productos medicinales, especialmente para la medicina tradicional. A pesar de que la biodiversidad en el medio ambiente marino supera con creces la del medio terrestre, la investigación sobre el uso de los productos naturales de fuentes marinas como agentes farmacéuticos se encuentra todavía poco desarrollada, durante la última década se han aislado alrededor de 5.000 nuevos compuestos de las aguas superficiales de mar (Gamal 2010).

La flora y fauna marina son excelentes fuentes de compuestos bioactivos con beneficios terapéuticos, la biodiversidad del medio marino y su diversidad química asociada se traduce en un recurso casi ilimitado de nuevos compuestos bioactivos. Los compuestos bioactivos marinos se pueden aislar de varias fuentes, incluyendo plantas marinas, animales, microorganismos, esponjas y algas (Suleria et al. 2015).



Las algas marinas viven generalmente unidas a rocas u otros sustratos de las zonas costeras. Pertenecen a tres grupos diferentes, empíricamente distinguidos desde mediados del siglo XIX por su color de la base del talo: las algas rojas (phylum Rhodophyta), algas pardas (phylum Heterokontophyta, también conocido como el Ochrophyta, clase Phaeophyceae), y las algas verdes (phylum Chlorophyta, clases Bryopsidophyceae, Chlorophyceae, Dasycladophyceae, Prasinophyceae, y Ulvophyceae). Distinguir estos tres filos, sin embargo, implica diferencias más sustanciales que las indicadas por esta denominación sencilla. Además de la pigmentación, difieren considerablemente en muchas características ultraestructurales y bioquímicas, incluidas los pigmentos fotosintéticos, compuestos de almacenamiento, composición de las paredes celulares, entre otras (Rindi y Soler-Vila 2012).

La clasificación de las algas ha experimentado grandes cambios a lo largo de los últimos 30 años, y hasta el momento no existe un esquema general aceptado por todos los ficólogos. Las diferentes clasificaciones varían entre 5 y 16 divisiones.

En el presente trabajo se utilizaron algas marinas mexicanas pertenecientes a la clase Phaeophyceae, Rhodophyceae y Chlorophyceae de las cuales se describe su clasificación en la sección Material y Métodos.

#### **2.1.2.2 Recursos algales mexicanos**

México cuenta con 2 grandes regiones costeras, el Pacífico en donde existen alrededor 100 especies de macroalgas marinas y en el Atlántico alrededor de 800. En el Pacífico mexicano, frente a las costas de Baja California, se distribuye un gran número de especies de macroalgas de valor comercial destinadas como materias primas para la producción de ficocoloides (alginatos, agar y carragenanos). Entre estas especies se encuentran el alga parda *Macrocystis pyrifera*, y las algas rojas *Gelidium robustum* y *Chondracanthus canaliculatus* así como la especie *Gracilariopsis longissima* (Pacheco-Ruiz et al. 2002).



Recientemente se ha estudiado la actividad antioxidante, antimutagénica y antiproliferativa de algas provenientes de Sinaloa, concluyendo que los flavonoides y clorofilas extraídas de *S. filamentosa*, *R. riparium* y *C. Sertularioides* poseen un alto potencial quimioprotector. Se deben realizar esfuerzos significativos para identificar y aislar los compuestos bioactivos que participan en las actividades antioxidantes, antimutagénicas y antiproliferativas de estas especies de algas marinas, pero particularmente en *C. sertularioides*, que mostró un alto potencial para futuras investigaciones para proponer nuevos biocompuestos terapéuticos (Osuna-Ruiz et al. 2016).

A pesar de que en México existen especies susceptibles de emplearse como alimento humano, no hay un aprovechamiento consolidado de estos recursos, ni para la alimentación ni para otros fines como los relacionados a la salud humana, por lo que son una fuente poco explorada de compuestos biológicamente activos.

### **2.1.2.3 Compuestos biológicamente activos en algas**

Las algas marinas son abundantes en las zonas intermareales y en aguas tropicales, de las tres divisiones principales de macroalgas marinas (Chlorophyta, Phaeophyta y Rhodophyta), existen diversos compuestos bioactivos de los que se ha reportado su potencial nutracéutico y farmacéutico (Shalaby 2011).

Las algas, producen una variedad de compuestos notables denominados colectivamente como metabolitos secundarios. Se sintetizan por estos organismos al final de la fase de crecimiento y/o debido a alteraciones metabólicas inducidas por condiciones de estrés ambiental. Los carotenoides, compuestos fenólicos, pigmentos, polisacáridos y ácidos grasos insaturados son compuestos derivados de algas que se ha reportado poseen actividades biológicas variables, incluyendo la actividad antioxidante, actividad anticancerígena y actividad antimicrobiana contra bacterias, virus y hongos (Tabla 2) (Shalaby 2011).

**Tabla 2.** Algunos ejemplos de compuestos biológicamente activos de las algas y su efecto.

<b>Alga</b>	<b>Ingrediente funcional</b>	<b>Posible efecto biológico</b>
<i>Sargassum vulgare</i>	<b>Xilofucanos</b>	<b>Actividad antiviral</b>
<i>Himanthalia elongate</i>	PUFAs	Reduce el riesgo de enfermedades cardiacas
	a- tocoferol	Actividad Antioxidante
<i>Unidaria pinnatifida</i>	PUFAs	Reduce el riesgo de enfermedades cardiacas
	Esteroles	Reduce el colesterol
	Folatos	Actividad antitumoral
	<b>Polisacáridos sulfatados</b>	<b>Actividad antiviral</b>
<i>Phorphira spp</i>	PUFAs	Reduce el riesgo de enfermedades cardiacas
	Esteroles	Reduce el colesterol
<i>Chondrus crispus</i>	PUFAs	Reduce el riesgo de enfermedades cardiacas
	Esteroles	Reduce el colesterol
<i>Cystoseira spp</i>	Polisacáridos sulfatados	Actividad pro-apoptótica
	Terpenos	Actividades diversas

\*(Shalaby 2011)

El alga roja *Sphaerococcus coronopifolius* ha demostrado tener actividad antibacteriana; el alga verde *Ulva lactuca* demostró poseer un compuesto anti-inflamatorio; y un compuesto antitumoral se aisló a partir *Portieria hornemannii*. También se ha descubierto en *Stypodium zonale*, un metabolito citotóxico, stypoldione, que inhibe la polimerización de los microtúbulos y por lo tanto previene la formación del huso mitótico. Se ha aislado de *Hypnea valitiae* un potente inhibidor de la adenosina quinasa que se puede utilizar en una variedad de estudios sobre el metabolismo y la regulación de nucleótidos (Shalaby 2011).

Se han aislado terpenos, alcaloides, péptidos, polisacáridos y polifenoles, entre otros compuestos de diferentes algas marinas, de los cuales se ha demostrado una potente actividad antiviral.

En 1991, se aisló un aldehído diterpeno del alga marina *Halimeda tuna* que mostró actividad antiviral contra el coronavirus murino A59 in vitro (Koehn et al. 1991). En 1992 Garg et al. aislaron el derivado antiviral, esfingosina, N-palmitoil-2-amino-1,3,4,5 tetrahydroxyoctadecane del cual se demostró que poseía actividad antiviral in vivo contra el Semeliki forest virus (SFV). Este compuesto se aisló del alga verde *Ulva fasciata*. (Garg et al. 1992).

Un dieno caracterizado a partir del alga parda *Dictyota pfaffi* demostró una fuerte actividad antiviral in vitro anti-VHS-1, pero poca inhibición de la transcriptasa inversa de HIV-1 (Barbosa et al. 2004). En el año 2004 Diterpernos aislados del alga *D. menstrualis* mostraron actividad antirretroviral in vitro (Pereira HS et al. 2004). Diacilglicerol extraídos de *Gigartina tenella*, *Symphyocladia latiuscula* y *Ishige okamurai* mostraron actividad antiviral contra HIV-1, HSV-1 y HSV-2 respectivamente (Gamal 2010).

El presente trabajo se enfocará específicamente en la actividad antiviral de polisacáridos sulfatados y polifenoles provenientes de algas verdes, pardas y rojas, los cuales se describen a detalle a continuación.

### 2.1.3 Polisacáridos sulfatados

Los polisacáridos son polímeros de azúcares simples (monosacáridos) vinculados entre sí por enlaces glucosídicos, y tienen numerosas aplicaciones comerciales en productos tales como estabilizantes, espesantes, emulsionantes, alimentos, alimentación, bebidas, etc (Kraan 2012).

Las algas marinas contienen grandes cantidades de polisacáridos (PS) que se encuentran principalmente formando la pared celular estructural, éstos se clasifican según su fuente como carragenanos aquellos que provienen de algas rojas, fucoidanes y alginatos en algas pardas y ulvanes en algas verdes (Ngo y Kim 2013). La actividad antiviral de los polisacáridos de algas marinas se demostró por primera vez por Gerber en 1958, quien observó que los polisacáridos extraídos de *Gelidium cartilagenium* (Rhodophyceae) protegían a los embriones de pollo contra la influenza B en ensayos in vivo (Gerber et al. 1958).

Muchas especies de algas marinas contienen cantidades significativas de PS que han demostrado inhibir la replicación de virus envueltos miembros de las familias flavivirus, togavirus, arenavirus, rhabdovirus, orthopoxvirus, y herpesvirus (Jha y Zi-rong 2004).

La actividad antiviral depende de las propiedades químicas del polisacárido, por lo que es de gran importancia la caracterización del grado de sulfatación, el peso molecular, azúcares constituyentes, conformación y estereoquímica dinámica. Se ha observado que en la mayoría de los casos la actividad antiviral es proporcional a la sulfatación presente en los polisacáridos. Polisacáridos con bajos grados de sulfatación generalmente no poseen actividad antiviral; además del grado de sulfatación, la distribución de los grupos sulfato desempeña un papel importante en la actividad antiviral (Wijesekara et al. 2011).

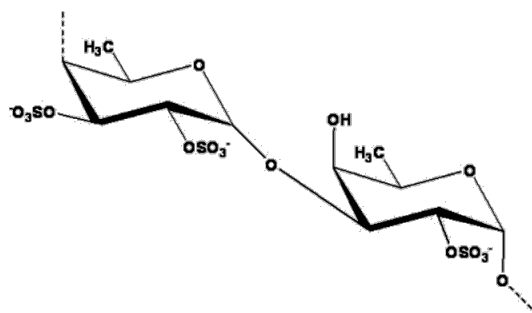
### 2.1.3.1 Polisacáridos Sulfatados de Algas Pardas

Los fucoidanes son un grupo de polisacáridos principalmente compuestos de L-fucosa y con menos de 10% de otros monosacáridos. Son ampliamente encontrados en las paredes celulares de algas pardas, pero no en otras algas o plantas superiores (Berteau y Mulloy 2003)

El fucoidan constituye la pared celular de refuerzo y parece estar asociado con protección contra los efectos de la desecación cuando las algas se exponen a marea baja (Li et al. 2008)

Los primeros fucoidanes fueron aislados por Kylin hace poco más de un siglo y desde entonces se les ha encontrado un sin fin de actividades biológicas. Pueden constituir más del 40% del peso seco de las paredes celulares de algas y son viscosos en concentraciones muy bajas (Berteau y Mulloy 2003; Li et al. 2008)

Su complejidad estructural varía en el grado de ramificación, sustituyentes, sulfatación y tipo de enlaces (Figura3). Aunque su composición varía según la especie y su origen geográfico, los fucoidanes siempre contienen fucosa y sulfato, con pequeñas proporciones de ácidos urónicos, galactosa, xilosa, arabinosa y manosa (Damonte et al. 2004).



**Figura 3.** Estructura química del fucoidán

En comparación con otros PS, los fucoidanes están más disponibles por que suelen ser más económicos, y son los que han sido más investigados para el desarrollo de nuevos fármacos en los últimos años (Li et al. 2008).

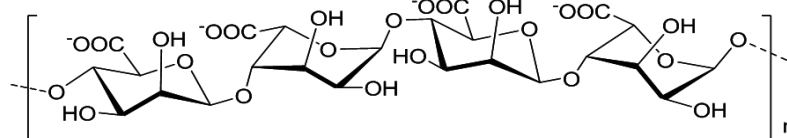
Se han reportado múltiples estudios con respecto a la actividad biológica del fucoidan en la salud humana, por ejemplo, el fucoidan encontrado en las algas marinas como *Undaria* y *Laminaria* ha mostrado propiedades anticoagulantes, antiviral y antitumoral (Zhuang et al. 1995; Chevolot et al. 1999).

Se ha observado la actividad antiviral de fucoidanes de diversas algas pardas y su mecanismo de acción en la inhibición de la infección de virus envueltos (Tabla 3) (Ahmadi et al. 2015). En nuestro grupo de trabajo se demostró que el mecanismo de acción del fucoidan de *Cladosiphon okamuranus* sobre NDV y CDV ocurrió inhibiendo la adsorción viral, así como inhibiendo la formación de sincicios inducida por el virus (Elizondo-Gonzalez et al. 2012; Trejo-Avila et al. 2014).

**Tabla 3.** Actividad antiviral de polisacáridos sulfatados provenientes de algas pardas.

<b>Alga parda</b>	<b>Virus</b>	<b>Características</b>	<b>Referencia</b>
<i>D. mertensii</i> , <i>F. Vesiculosus</i>	HIV	Inhibe la actividad transcriptasa reversa	(Queiroz et al. 2008)
<i>C. okamuranus</i>	DENV-2	No inhibió otros serotipos de DENV	(Hidari et al. 2008)
<i>S. piluliferum</i>	Influenza	Actividad antiviral <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	(Akamatsu et al. 2003)
<i>C. indica</i>	HSV-1 y HSV-2	Inhiben adsorción viral, no mostró actividad virucida	(Mandal et al. 2007)
<i>A. utricularis</i>	HSV-1 y HSV-2	No mostró citotoxicidad e inhibió la entrada del virus a la célula.	(Ponce et al. 2003)
<i>U. pinnatifida</i>	HSV-1 y HSV-2	Inhiben adsorción y entrada del virus a la célula	(Thompson y Dragar 2004)
<i>S. marginatum</i>	HSV-1 y HSV-2	Posee actividad anticoagulante a altas concentraciones y actividad antiviral a bajas concentraciones.	(Adhikari et al. 2006)
<i>C. Okamuranus</i>	CDV y NDV	Inhibe la adsorción y entrada del virus a la célula y la formación de sincicios	(Elizondo-Gonzalez et al. 2012)

Los alginatos son polisacáridos sulfatados encontrados en algas pardas, su estructura es lineal y se constituyen por una columna vertebral central de ácido poli-D-glucurónico (bloques G), ácido poli-D-manurónico (bloques M) y residuos alternos de ácido D-gulurónico y ácido D-manurónico (bloques GM)(Figura4) (Wang et al. 2012).



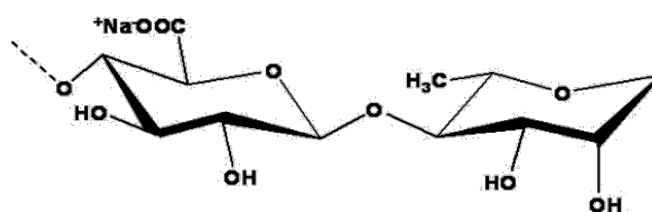
**Figura 4.** Estructura química de alginatos en bloques GM

Se ha desarrollado un nuevo fármaco marino con actividad antiviral anti-HIV, a partir de alginatos, que actualmente se encuentra en fase II de estudios clínicos (Xianliang et al. 2000; Wang et al. 2012)

### **2.1.3.2 Polisacáridos sulfatados de algas verdes: Ulván**

Los ulvanes muestran varias características fisicoquímicas y biológicas de interés potencial para la industria alimentaria, farmacéutica, agrícola y aplicaciones químicas. El nombre ulván se deriva de los términos originales ulvin y ulvacin introducidos por Kylin en referencia a diferentes fracciones de polisacáridos sulfatados solubles en agua del alga *Ulva lactuca*. En la actualidad, este término se utiliza para referirse a los polisacáridos de los miembros de la familia de las Ulvales, principalmente al género *Ulva* (Lahaye y Robic 2007).

Los ulvanes son polisacáridos sulfatados, compuestos principalmente por monosacáridos como la ramnosa, el ácido urónico y la xilosa, así como por disacáridos; como el ácido urónico, glucurónico e irudónico (Figura 5) (Damonte et al. 2004).



**Figura 5.** Estructura química del ulvan

El peso molecular promedio de los ulvanes varía de 189 a 8.200 kDa y representan de un 38% a un 54% del peso seco del alga. La ramnosa es un componente importante en el ulván, es un azúcar poco frecuente, utilizado como un precursor para la síntesis de compuestos aromáticos con gran aplicación en la industria farmacéutica (Lahaye y Robic 2007).

Se han reportado múltiples actividades biológicas de los ulvanes, de las que destacan la actividad antitrombótica, antiviral y antitumoral (Paradossi et al. 2002).

Estudios recientes han demostrado que ulvan es capaz de modificar la adhesión y proliferación de células normales y tumorales de colon humano, así como la expresión del factor de crecimiento transformante (TGF) y marcadores de superficie relacionados con la diferenciación celular (Lahaye y Robic 2007).

Los PS de algas verdes han sido considerados nuevas fuentes de productos naturales para el desarrollo de fármacos antivirales. Previamente se ha reportado la actividad antiviral de PS de algas verdes contra diferentes virus envueltos (Tabla 4) (Wang et al. 2014)



**Tabla 4.** Actividad antiviral de polisacáridos sulfatados provenientes de algas verdes.

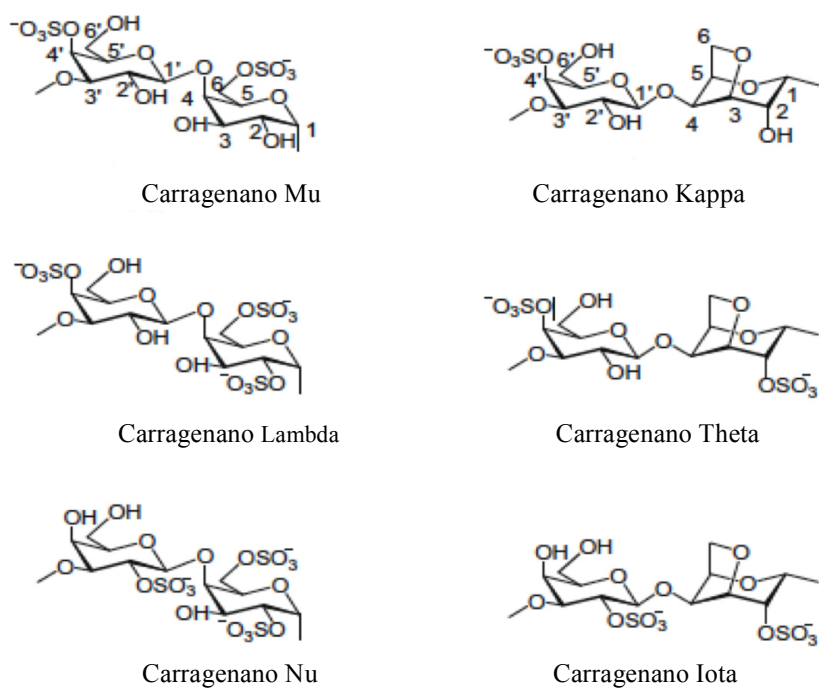
<b>Alga verde</b>	<b>Virus</b>	<b>Características</b>	<b>Referencia</b>
<i>M. latissimum</i>	HSV-1, CMV, HIV	Inhibe la adsorción viral	(Lee et al. 1999)
<i>E. compressa</i> , <i>C. Brachypus</i> , <i>C. latum</i>	HSV-1	Inhiben la adsorción y entrada del virus a la célula	(Lee et al. 2004)
<i>G. oxysperma</i>	HSV-1 y HSV-2	Rico en ramnosa	(Cassolato et al. 2008)
<i>M. nitidum</i>	HSV-2	Inhiben la adsorción y entrada del virus a la célula	(Lee et al. 2010)
<i>U. lactuca</i>	JEV	Inhiben la adsorción y entrada del virus a la célula	(Chiu et al. 2012a)
<i>C. racemosa</i>	DENV-2	Inhiben la adsorción y entrada del virus a la célula	(Pujol et al. 2012)
<i>U. Clathrata</i>	NDV	Inhibe la infección célula-célula	(Aguilar-Briseño et al. 2015)

### **2.1.3.3 Polisacáridos sulfatados de algas rojas: Carragenanos**

Los carragenanos, una familia de PS aislados a partir de algas rojas marinas (Rhodophyta), son ampliamente utilizados como alimentos, aditivos, emulsionantes, estabilizantes y espesantes (Campo et al. 2009). El nombre carragenano se deriva de las especies *Chondrus crispus* de algas conocidas como musgo de Irlanda en Inglaterra, y Carraigin en Irlanda. Las algas rojas, fuentes de estos carbohidratos, crecen a lo largo de las costas de América del Norte y Europa (Necas y Bartosikova 2013).

Los carragenanos de algas rojas se dividen tradicionalmente en seis tipos diferentes de acuerdo a su estructura: Iota ( $\iota$ ), Kappa ( $\kappa$ ), Lambda ( $\lambda$ ), Mu ( $\mu$ ), Nu ( $\nu$ ) y Theta ( $\theta$ ), (Figura 6). Esta nomenclatura es relevante tanto para su clasificación química como para su producción comercial. Los tres más importantes carragenanos en la industria son los de tipo iota, kappa y lambda. Tienen una gran variedad de aplicaciones comerciales, especialmente en la industria alimentaria, también se utilizan en diversos productos no alimenticios, tales como productos farmacéuticos, cosméticos, impresión, formulaciones textiles y han sido estudiados por sus actividades biológicas. Son

utilizados clásicamente como agentes inflamatorios y poseen una potencial aplicación farmacéutica debido a sus propiedades biológicas, como su actividad antitumoral, inmunomoduladora, anticoagulante y antiviral (Campo et al. 2009).



**Figura 6.** Representación esquemática de las unidades que se presentan de manera repetida en los diferentes carragenanos.

La actividad antiviral de los carragenanos ha sido ampliamente estudiada y se ha observado que son inhibidores selectivos de varios virus envueltos y virus no envueltos, actuando predominantemente mediante la inhibición de la unión del virus a la célula huésped e internalización del mismo dentro de la célula (Tabla 5).

**Tabla 5.** Actividad antiviral de polisacáridos sulfatados provenientes de algas rojas.

<b>Carragenano</b>	<b>Virus</b>	<b>Referencia</b>
<i>Iota y lambda</i>	HSV-1 y HSV-2	(Carlucci et al. 1997)
<i>Iota y gamma</i>	HPV	(Buck et al. 2006)
<i>Iota</i>	Influenza	(Leibbrandt et al. 2010)
<i>Iota</i>	Rhinovirus	(Eccles et al. 2010)
<i>Iota</i>	DENV	(Talarico et al. 2011)
<i>Kappa</i>	Enterovirus	(Chiu et al. 2012b)

#### **2.1.3.4 Mecanismo de acción antiviral de los Polisacáridos sulfatados**

Los PS pueden inhibir la replicación de los virus interfiriendo en el ciclo de vida viral, pueden inhibir la partícula viral (efecto virucida) o bien pueden mejorar la respuesta inmune antiviral para acelerar el proceso de eliminación del virus. El ciclo de vida de los virus difiere en gran medida entre las especies, pero hay seis etapas básicas del ciclo de vida de los virus: adsorción, penetración, liberación de la cápside, biosíntesis, ensamblaje y liberación de la progenie viral (Wang et al. 2012).

El mecanismo antiviral de los PS está comúnmente relacionado con las características específicas de la estructura y el serotipo viral; pueden inhibir el ciclo de vida viral en diferentes etapas o inactivar directamente viriones antes de la infección viral (actividad virucida) (Damonte et al. 2004).

Se ha reportado que los carragenanos poseen actividad virucida contra virus envueltos, lo que hace que el virus pierda la capacidad para infectar las células y que por ende, se inhiba la multiplicación del virus. Carlucci et al. encontraron que los carragenanos tipo  $\lambda$  pueden unirse firmemente al virus herpes simplex (HSV), lo que lleva a la inactivación del virión, inhibiendo así la replicación de HSV, sus estudios sugieren, además, que la carragenina cambia la estructura de las glicoproteínas gB y gC del HSV (Carlucci et al. 2012).

Varios estudios han demostrado que los carragenanos pueden cubrir la carga positiva de la superficie de la célula huésped por la carga negativa de sus grupos sulfato, con el fin de interferir con el proceso de adsorción de los virus, Carlucci et al. han demostrado que los carragenanos de *Gigartina skottsbergii* tienen efecto antiviral contra la etapa de adsorción del virus HSV-1 y HSV-2 a la célula (Carlucci et al. 1997).

El proceso de entrada de algunos virus ocurre por endocitosis e implica el transporte vesicular a través del citoplasma, y la entrega de los endosomas y otros organelos intracelulares. La liberación de la cápside generalmente se produce después de la entrada viral; algunos PS pueden interferir con la entrada del virus, Buck et al. encontraron que los carragenanos pueden unirse directamente a la cápside de HPV, con el objetivo de inhibir no sólo el proceso de adsorción viral, sino también la posterior entrada y liberación de la cápside. Por otra parte, Talarico y colaboradores demostraron que carragenanos tipo  $\lambda$  y  $\beta$  interfieren con la adsorción y entrada del DENV-2 y que solo presenta eficacia si se añade junto con el virus o poco después de la infección (Buck et al. 2006; Talarico et al. 2011).

Los PS de bajo peso molecular no solo inhiben el proceso de entrada del virus a la célula si no también pueden inhibir la transcripción y replicación del virus. Se ha observado que ciertos carragenanos que no tienen efecto en la adsorción y entrada viral han disminuido la síntesis de proteínas virales.

El principal mecanismo de actividad antiviral de los fucoidanes ocurre al inhibir la unión de las partículas virales a la células huésped, sin embargo Queiroz et al. encontraron que los fucoidanes aislados de *F. vesiculosus* inhiben la transcriptasa inversa del HIV a una concentración de 0.5 a 1.0 mg/mL, ellos demostraron que la actividad antiviral de estos fucoidanes no sólo depende de los cambios iónicos sino también de los anillos de azúcar que actúan orientando espacialmente las cargas en una configuración específica que es reconocida por la enzima, determinando de este modo la especificidad de la unión (Queiroz et al. 2008).

Se ha demostrado que el fucoidan extraído de *C. okamuranus* actúa inhibiendo los eventos de fusión del virus (virus-célula y célula-célula) probablemente bloqueando la proteína F. Los ulvanes extraídos del alga *Ulva clathrata* han demostrado tener un mejor efecto en la inhibición de la formación de sincicios por medio de este mecanismo, la mezcla de ambos (ulvan de *Ulva clathrata* y fucoidan de *C. okamuranus*) mostró un efecto antiviral mayor que al probar el PS solo, sin embargo se observó que el ulvan antagoniza el efecto de fucoidan sobre la adsorción y entrada viral (Elizondo-Gonzalez et al. 2012; Aguilar-Briseño et al. 2015).

#### **2.1.4 Polifenoles**

Son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal superior que se pueden distinguir por las siguientes características generales:

*Solubilidad en agua-* Poseen una solubilidad mínima en medios acuosos debido a su estructura química y las interacciones polifenol-polifenol.

*Peso molecular-* Los polifenoles naturales poseen un rango de peso molecular de 500 a 4000 g/mol.

*Estructura y carácter polifenólico-* Poseen en promedio de 12 a 16 grupos fenólicos y 5 a 7 anillos aromáticos.

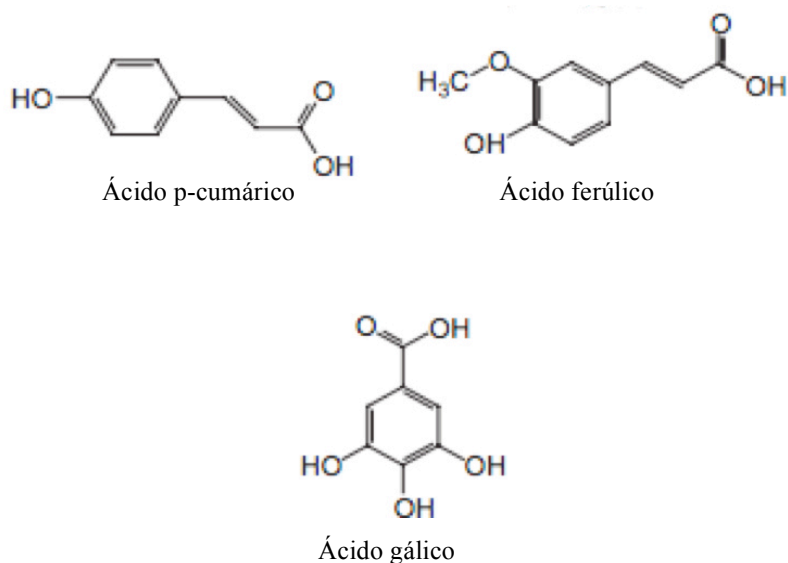
*Complementación intermolecular-* Además de dar las reacciones fenólicas usuales, tienen la capacidad de precipitar algunos alcaloides y proteínas (Haslama y Caib 1994).

##### **2.1.4.1 Clasificación de Polifenoles de acuerdo a su estructura**

Los polifenoles se pueden clasificar de distintas formas, la clasificación de acuerdo a su estructura (una de las más utilizadas) y consiste en los siguientes grupos:

*Ácidos fenólicos:* Son fenoles que poseen una funcionalidad ácido carboxílico. Los ácidos fenólicos contienen dos estructuras de carbono constitutivas distintivas:

estructuras hidroxicinámicas e hidroxibenzoicas. Los números y la posición de los grupos hidroxilo en el anillo aromático crea una amplia variedad de estructuras y compuestos (Figura 7).

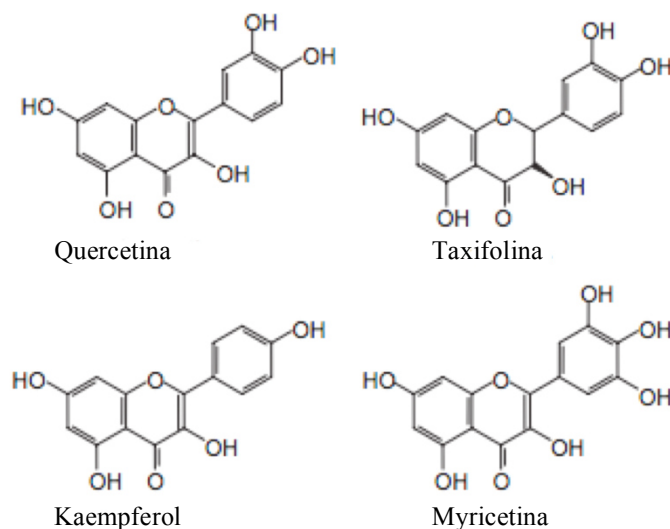


**Figura 7.** Estructura de ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos en las plantas se han conectado con diversas funciones, tales como absorción de nutrientes, síntesis de proteínas, actividad enzimática, fotosíntesis y componentes estructurales. La interrelación entre la capacidad antioxidante y la actividad vasodilatadora de los derivados del ácido hidroxibenzoico y el ácido hidroxicinámico del vino ha sido bien estudiada (Mudnic et al. 2010). El ácido cafeico y algunos de sus ésteres pueden poseer actividad antitumoral contra la carcinogénesis del colon y actúan como inhibidores selectivos de la integrasa del tipo I de la inmunodeficiencia humana (Koshihara et al. 1984; King et al. 1999).

*Flavonoides:* Los flavonoides constituyen el grupo más grande de compuestos fenólicos vegetales, lo que representa más de la mitad de los ocho mil compuestos fenólicos naturales. Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular compuestos de quince átomos de carbono, dispuestos en una configuración C6-C3-C6 (Figura 8). Esencialmente, la estructura consiste en dos anillos aromáticos A y B, unidos por un

punto de 3 carbonos, usualmente en forma de un anillo heterocíclico. Las variaciones en los patrones de sustitución del anillo C dan lugar a las clases principales de flavonoides, es decir, flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanoles (catequinas), isoflavonas, flavanonoles y antocianidinas (Harborne y Williams 2000).



**Figura 8.** Estructura de flavonoides

Los flavonoides funcionan como moléculas antioxidantes, también se les han encontrado otras propiedades, tales como la actividad anti-cáncer, anti-aterosclerótica, anti-mutagénica, anti-viral, anti-neoplásica, antialérgica, antitrombótica y vasodilatadora (Li et al. 2014).

*Antocianinas:* Las antocianinas son el grupo más importante de pigmentos solubles en agua en el reino vegetal y son responsables de la mayoría de los colores rojo, azul y púrpura de frutas, verduras, flores y otros tejidos vegetales (Harborne y Williams 2000).

Son considerados componentes importantes en la nutrición humana, numerosos estudios informan una alta correlación positiva entre el contenido de pigmento de frutas o verduras y las capacidades antioxidantes. Los extractos de frutas rojas que son ricas en

antocianinas se usan en la medicina popular y tienen algunos efectos terapéuticos positivos como agentes antiinflamatorios (Mcdougall et al. 2009, Thomas y Kim 2011).

*Taninos:* Los taninos son compuestos de peso molecular relativamente alto, que constituyen el tercer grupo importante de compuestos fenólicos, y pueden subdividirse en taninos hidrolizables y condensados. Los taninos hidrolizables son ésteres de ácido gálico, mientras que los taninos condensados son polímeros de monómeros de polihidroxiflavan-3-ol. Una tercera subdivisión, los florotaninos consisten enteramente de floroglucinol y han sido aislados de varios géneros de algas marrones. Los taninos son polifenoles, que se unen a proteínas y compuestos básicos, tales como alcaloides o iones metálicos pesados en una solución y los hacen insolubles e inducen la precipitación (Okuda 2006; Ajila et al. 2010).

*Ligninas:* Son un grupo de difenoles relativamente simples, se encuentran en una amplia variedad de alimentos vegetales, principalmente semillas oleaginosas, granos de cereales, verduras, frutas y legumbres. Se sabe que la semilla de lino y el té son una rica fuente de lignanos. Pueden presentarse como monómeros como en el té, como una mezcla de monómeros y oligómeros como en el caso del brócoli o predominantemente como oligómeros como en el caso de las semillas de lino. La lignina vegetal cuando se ingiere es convertida por bacterias en el intestino grueso en dos fenoles simples: enterolactona y enterodiol. La enterolactona es un inhibidor moderado de la síntesis de estrógenos y reduce los niveles de estrógeno, mientras que el enterodiol es un inhibidor débil. Por lo tanto, las ligninas vegetales se consideran una de las varias clases de fitoestrógenos y también son eficaces como antioxidantes y ayudan a reducir el riesgo de cáncer y enfermedades cardiovasculares (Vanharanta et al. 1999). Con respecto a la identificación de polifenoles con actividad biológica provenientes de algas, se han identificado florotaninos (taninos encontrados exclusivamente en algas del phylum Phaeophyta) con actividad antioxidante en el alga *S. Fusiforme*, compuestos fenólicos derivados de ácido gálico en *E. prolifera* con actividad antitumoral y flavonoides y clorofilas extraídos de *S. filamentosa*, *R. riparium* y *C. Sertularioides* provenientes de



Sinaloa con actividad antioxidante, antimutagénica y antiproliferativa (Osuna-Ruiz et al. 2016, Li et al. 2017, Michalak et al. 2017).

### **2.1.5 Actividad antiviral de metabolitos secundarios de algas contra Paramixovirus.**

Como se mencionó anteriormente, se ha observado el efecto antiviral de los PS en virus envueltos, entre ellos los pertenecientes a la familia Paramixoviridae; nuestro grupo de trabajo ha estudiado el efecto *in vitro* del fucoidán de *Cladosiphon okamuranus* contra el virus NDV y CDV, e *in ovo* contra NDV, encontrando un efecto antiviral, no citotóxico, con un índice de selectividad excelente  $IS_{50} > 2000$ , inhibiendo la penetración de NDV a la célula hospedera y la formación de sincicios; posiblemente su efecto es ejercido sobre la maduración de la proteína de fusión viral (Elizondo-Gonzalez et al. 2012; Trejo-Avila et al. 2014).

Recientemente se ha reportado la actividad antiviral del ulván proveniente de *Ulva clathrata* contra NDV, analizando su actividad antiviral tanto en particular como en conjunto con fucoidán. Observando una mayor inhibición de la formación de sincicios en la mezcla de ambos PS comparada con el efecto individual de cada uno de ellos (Aguilar-Briseño et al. 2015).

Con respecto a la actividad antiviral de los polifenoles, se ha reportado para otros virus envueltos como se ha mencionado previamente; sin embargo no ha sido reportada específicamente para paramixovirus.

## **2.2 Terapia antiviral combinada**

En el campo de la terapia antiviral, hoy en día, la combinación de múltiples fármacos es un enfoque primario para la mejora de los efectos antivirales. La terapia antiviral combinada presenta múltiples ventajas, entre las que se encuentran la reducción

de las dosis de los fármacos individuales, una disminución en los efectos secundarios de agentes antivirales, y la prevención de la aparición de virus farmacorresistentes (Koizumi y Iwami 2014).

La terapia antiviral combinada ha sido probada con éxito desde el año de 1996 con la inclusión de la terapia antirretroviral combinada (HAART); la combinación de 2 o más antivirales no solo ha sido efectiva contra HIV, también ha mostrado alta efectividad contra HCV y actividad sinérgica contra diferentes enterovirus (Kang et al. 2015, Lin et al. 2016).

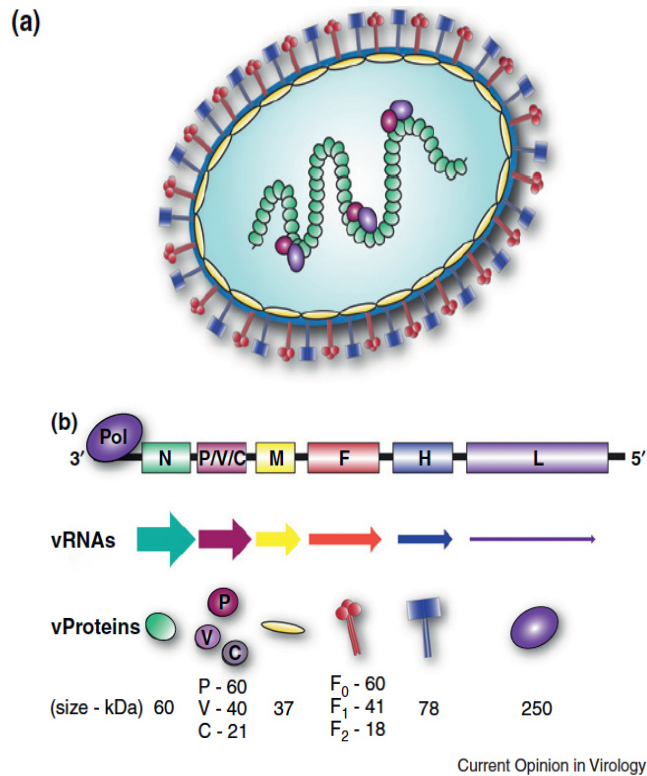
Los polisacáridos sulfatados han sido probados en combinación con otros antivirales comerciales; el fucoidan de *Fucus vesiculosus* mostró actividad sinérgica contra HIV al combinarse con AZT, carragenanos tipo iota y gamma han sido probados en combinación con Zanamivir en un modelo *in vitro* y en un modelo murino utilizando un aerosol nasal, observando una fuerte actividad sinérgica contra influenza A (Sugawara et al. 1898; Morokutti-kurz et al. 2015).

## **2.3 Virus del sarampión**

### **2.3.1 Clasificación y características generales.**

El virus del sarampión fue aislado en cultivo celular en 1954, y a partir de ese momento, el grupo de investigadores bajo la tutela de John F. Enders llevó a cabo la investigación, el desarrollo y los estudios clínicos iniciales para la autorización en 1963 de una vacuna atenuada (Griffin y Oldstone 2009).

El virus del sarampión es un virus de RNA de polaridad negativa que posee un genoma no segmentado y una envoltura lipídica, con un diámetro entre 100 y 300nm, pertenece al género Morbilivirus de la familia Paramyxoviridae (Figura 9a) (Moss y Griffin 2006, 2012).



**Figura 9.** Representación esquemática del virus de sarampión (a) y su genoma (b)

El genoma de alrededor de 16 kb (Figura 9b) codifica para ocho proteínas y según sus análisis filogenéticos, se dice que pudo haber evolucionado a partir de virus de la peste bovina, una enfermedad ya erradicada del ganado ((Barrett 1999, Furuse et al. 2010, Horzinek 2011).

Seis proteínas se encuentran constituyendo el virión, la hemagglutinina (H) y la proteína de fusión (F) que son glicoproteínas presentes en la envoltura viral, la proteína de matriz (M), que recubre el interior, la proteína de la cápside (N), la fosfoproteína (P) y la polimerasa (L). La nucleocápside helicoidal, se forma a partir del RNA genómico envuelto con la proteína de la nucleocápside (N), a la cual se encuentran unidas la fosfoproteína (P) y la polimerasa (L) (Figura ¿?) (Moss y Griffin 2012)

Existen dos proteínas no estructurales, C y V, que regulan la respuesta celular a la infección y modulan la señalización de interferón (IFN); C es producida por un sitio

de inicio alternativo de P en un proceso denominado “leaky scanning” y V por la edición del RNA que altera el marco de lectura y se produce una proteína de 68 aminoácidos rica en cisteína en el dominio C-terminal que está altamente conservada entre los paramixovirus (Bellini et al. 1985).

### **2.3.2 Replicación viral**

El virus del sarampión entra en las células por el mecanismo de fusión de membranas a un pH neutro. Dos glicoproteínas median este proceso: la hemaglutinina (H) y la proteína de fusión (F). La proteína H se une a los receptores celulares, mientras que la proteína F media la fusión de las membranas viral y celular. Tres receptores han sido identificados en la adsorción del virus a la célula, el cofactor de membrana o CD46, la molécula linfocitaria activadora de señales o SLAM y el receptor 4 relacionado a poliovirus (PVRL4) o nectina 4 (Moss y Griffin 2012).

CD46 es una proteína reguladora del complemento humano, actúa como un cofactor para la inactivación proteolítica de C3b/C4b por el factor I (Riley-Vargas et al., 2004), también induce la proliferación y diferenciación de las células T reguladoras. SLAM es una molécula coestimuladora que es expresada en células activadas por el sistema inmune. El dominio citoplasmático tiene un motivo inmunoreceptor basado en tirosinas que se une al dominio SH-2 de proteínas adaptadoras, lo que es importante en la señalización celular. Nectina 4 es una inmunoglobulina de uniones adherentes presente en células epiteliales (Ono et al. 2001, Shirogane et al. 2010).

Las células infectadas expresan las glicoproteínas virales en la superficie celular, por lo que pueden fusionarse con otras células no infectadas produciendo células gigantes multinucleadas comúnmente llamadas sincicios. Sin embargo, no todas las células infectadas forman sincicios, por ejemplo se han observado sincicios en células infectadas provenientes de pulmón y piel, pero no en células del sistema nervioso (Moss y Griffin 2012).

Inmediatamente después de la fusión de la envoltura viral con la membrana celular se libera la ribonucleoproteína, la ribonucleoproteína (RNP) es la unidad básica de la infectividad del virus del sarampión ya que es la encargada de la transcripción y replicación viral. Se ha demostrado que las poblaciones de virus se componen de partículas esféricas con diferentes diámetros de 300-1000 nm; por lo tanto, muchas partículas contienen más de un RNP funcional (Moss y Griffin 2012).

Además del RNA genómico, la RNP se compone de la proteína de la nucleocápside (N), la fosfoproteína(P) y la proteína grande (L). El complejo de la RNA polimerasa dependiente de RNA consiste en la proteína L y la proteína P y tiene funciones tanto de transcriptasa como de replicasa viral (Moss y Griffin 2012).

La RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) solo puede utilizar la ribonucleoproteína como “primer” y no el RNA desnudo para dar inicio a la transcripción. Aunque el complejo L/P contiene los sitios catalíticos necesarios para la RdRp, su actividad también puede ser modulada por proteínas de la célula huésped y/o componentes del citoesqueleto, tales como tubulina (Moss y Griffin 2012).

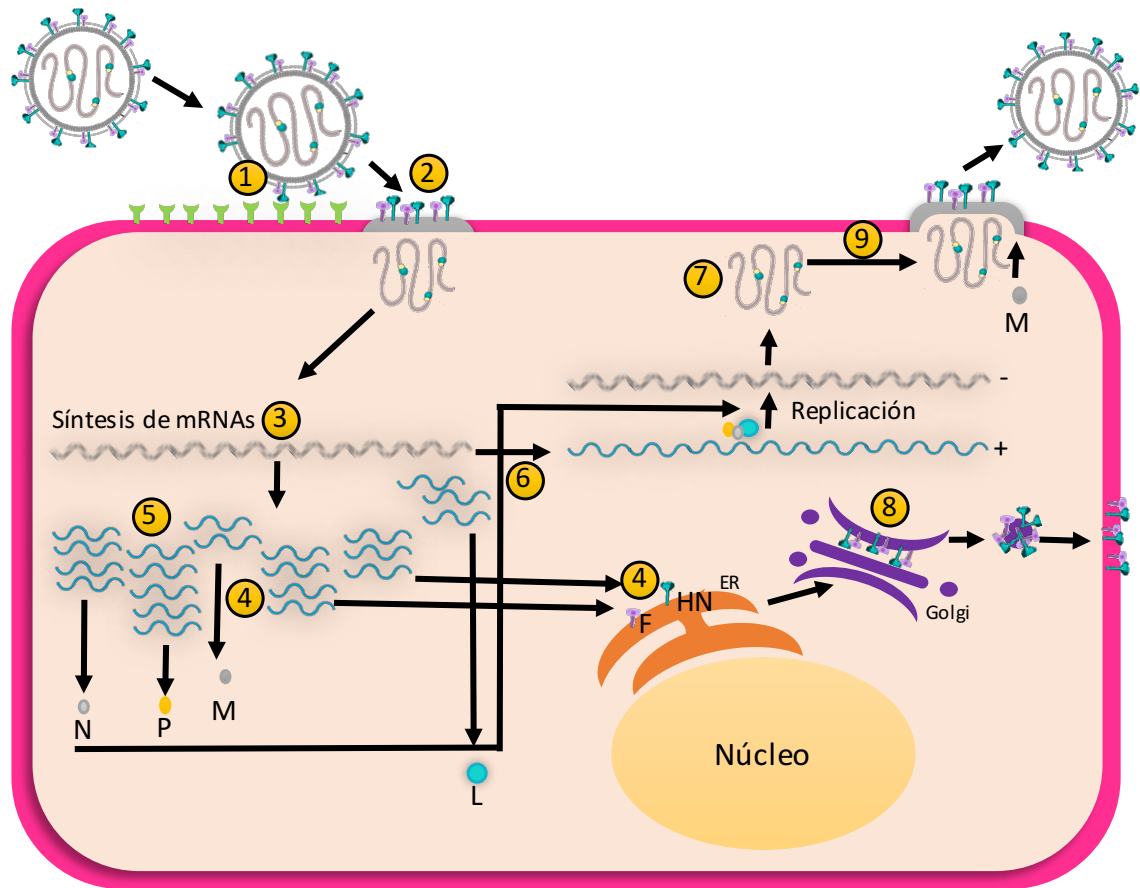
En el genoma del virus existen dos elementos reconocidos como secuencias promotoras, el primero es llamado caja A y comprende 15 nucleótidos ubicados en el extremo 3' del genoma y del antígeno; y la caja B, que está representada por la secuencia GN<sub>5</sub> GN<sub>5</sub> GN<sub>5</sub>, la cual se encuentra en seguida de la caja A (Moss y Griffin 2012).

La RdRp inicia la transcripción por un proceso denominado transcripción secuencial, el complejo de polimerización viral transcribe cada gen del RNA genómico. Una vez que los mensajeros sufren las modificaciones postranscripcionales, posteriormente ocurre la traducción. Las proteínas N, P y L impulsan la replicación del genoma para producir un RNA de cadena positiva de longitud completa, que entonces es la plantilla para la producción de los nuevos genomas virales (Lamb et al. 2006).

Las nucleocápsides virales son ensambladas en dos pasos, primero la recién sintetizada NP se asocia con el RNA genómico nascente para formar la estructura de la nucleocápside helicoidal, y segundo el complejo de polimerasa P-L se asocia con la nucleocápside. Las glicoproteínas HN y F son sintetizadas en el retículo endoplásmico, y después de su maduración son transportadas por la vía secretora a la membrana citoplásmica (Lamb et al. 2006).

La ribonucleoproteína interactúa con las proteínas de matriz y es guiada por esta misma justo bajo la membrana citoplasmática modificada; en este punto el virión se ensambla por completo al mismo tiempo que es liberado con la ayuda del complejo ESCRT (complejo endosomal requerido para transporte) (Moss y Griffin 2012).

La proteína HN presente en la membrana celular de la célula infectada es capaz de interactuar con el ácido siálico presente en las glicoproteínas de las células no infectadas y la proteína F madura (F1 y F2) es capaz de formar un poro de fusión entre las membranas plasmáticas de estas células, llevando a cabo la formación sincicios característica de los paramixovirus (Hines y Miller 2012).



**Figura 10. Replicación del virus de sarampión.** (1) El virión se une por unión a receptores específicos en la superficie de la célula. (2) Al unirse el virus al receptor, la membrana viral se fusiona con la membrana celular, liberando el genoma de sentido negativo, de cadena sencilla, en el citoplasma. (3) los mRNA se sintetizan a partir del molde mRNA de cadena negativa. Los genes están separados por medio de señales de terminación de la transcripción. (4) Los mRNA se traducen en las proteínas estructurales. (5) Se traducen las proteína reguladoras (C y V) codificadas a partir de la secuencia codificante del gen P. (6) Las proteínas N, P y L impulsan la replicación del genoma para producir un RNA de cadena positiva de longitud completa, que es usado como templado para la producción de nuevos genomas virales. (7) La ribonucleoproteína se ensambla en el citoplasma cuando las subunidades N libres se asocian con el genoma para formar una estructura helicoidal. (8) Las glicoproteínas virales son modificadas postraduccionalmente a medida que son transportadas a través del retículo endoplásmico y la red de Golgi a la superficie de la célula infectada. (9) La RNP adquiere su envoltura en la superficie celular a medida que brota a través de la membrana plasmática; se cree que la proteína M viral regula la asociación de la RNP con las glicoproteínas virales.

### **2.3.3 Epidemiología**

El sarampión es una enfermedad muy contagiosa y grave, en 1980, antes de que se generalizara el uso de la vacuna, el sarampión causaba cerca de 2,6 millones de muertes al año (WHO 2017).

La enfermedad sigue siendo una de las principales causas de muerte entre los niños pequeños a nivel mundial, a pesar de la disponibilidad de una vacuna segura y eficaz. Aproximadamente 134.200 personas murieron de sarampión en 2015, en su mayoría niños menores de 5 años(WHO 2017).

Las actividades de inmunización acelerada han tenido un impacto importante en la reducción de las muertes por sarampión. Durante 2000-2015, la vacunación contra el sarampión evitó un estimado de 20.3 millones de muertes. Las muertes mundiales por sarampión se han reducido en un 79% desde un estimado de 651 600 en 2000 a 134 200 en 2015 (WHO 2017).

El sarampión sigue siendo común en muchos países en desarrollo; sobre todo en zonas de África y Asia. La gran mayoría (más del 95%) de las muertes por sarampión se producen en países con bajos ingresos per cápita y con infraestructura de salud deficiente (WHO 2017).

Los brotes de sarampión pueden ser especialmente mortales en los países que experimentan o se recuperan de un desastre natural o un conflicto. Los daños a la infraestructura de salud y servicios de salud interrumpen la inmunización sistemática, y el hacinamiento en los campamentos residenciales aumenta en gran medida el riesgo de infección (WHO 2017).



Del 1 de enero al 22 de abril de 2017, se informó que 61 personas de 10 estados de EEUU (California, Florida, Michigan, Minnesota, Nebraska, Nueva Jersey, Nueva York, Pennsylvania, Utah y Washington) tenían sarampión. En 2016, se informó que 70 personas de 16 estados de EEUU tenían sarampión y en 2015 se informó de 188 casos (CDC 2017).

En 2014, los Estados Unidos experimentaron un número récord de casos de sarampión, con 667 casos de 27 estados reportados al Centro Nacional de Inmunización y Enfermedades Respiratorias de los CDC (NCIRD); este es el mayor número de casos desde que la eliminación del sarampión fue documentada en los Estados Unidos en 2000. La mayoría de las personas que se enfermaron de sarampión no fueron vacunadas (CDC 2017).

#### **2.3.4 Plan estratégico para la erradicación global de Sarampión**

Este plan global de diez años para erradicar sarampión y rubéola, expone la estrategia que debe ser aplicada para lograr los objetivos de erradicación de sarampión y rubéola aprobada por la Asamblea Mundial de la Salud (WHO 2012).

El plan establece la visión, metas y objetivos para el período 2011-2020, las estrategias recomendadas, principios, prioridades, el costo de alcanzar las metas y los retos, así como la forma de superarlos. El plan es desarrollado conjuntamente por la iniciativa contra el sarampión que está encabezada por la Cruz Roja Americana, los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC), la Fundación de las Naciones Unidas, UNICEF y la Organización Mundial de la Salud (WHO 2012).

El plan estuvo encaminado a reducir en dos tercios la tasa de mortalidad de los menores de cinco años entre 1990 y 2015. Tomando en cuenta el potencial de la vacuna contra el sarampión para disminuir la mortalidad en la niñez y dado que su cobertura puede considerarse un indicador del acceso a los servicios de salud infantil, la cobertura de la vacunación sistemática contra el sarampión ha sido seleccionada como un indicador de los progresos hacia este logro (WHO 2012).

En 2012 la Iniciativa presentó un nuevo Plan Estratégico Mundial contra el Sarampión y la Rubéola para el periodo 2012-2020, en el que se establecen nuevos objetivos mundiales para 2015 y 2020:

Para finales de 2015 se tenía planeado reducir la mortalidad mundial por sarampión como mínimo en un 95%, en comparación con los valores de 2000, alcanzar los objetivos regionales de eliminación del sarampión, la rubéola y el síndrome de rubéola congénita.

Para finales de 2020 se tiene planeado lograr la eliminación del sarampión y la rubéola al menos en cinco regiones de la OMS (WHO 2012).

La estrategia se centra en cinco componentes básicos:

- Alcanzar y mantener una elevada cobertura vacunal con dos dosis de vacunas que contengan antígenos del sarampión.
- Llevar a cabo una vigilancia eficaz de ambas enfermedades y evaluar las medidas programáticas para garantizar los progresos y el impacto positivo de las actividades de vacunación.
- Desarrollar y mantener la preparación ante los brotes, la respuesta rápida cuando se produzcan, y el tratamiento eficaz de los casos.
- Mantener la comunicación y la dedicación para lograr la confianza de la población y su demanda de inmunización;

- Llevar a cabo las actividades de investigación y desarrollo necesarias para respaldar medidas costo efectivas y mejorar la vacunación y los instrumentos diagnósticos.

Una combinación de enfoques profilácticos (vacunas) y terapéuticos (antivirales e inmunomoduladores) podrían contribuir a los obstáculos para la erradicación de estos virus y para el control de muchos otros virus de gran importancia en salud. Los antivirales podrían facilitar el rápido control de los brotes virales, suprimiendo la enfermedad o reduciendo la severidad de esta. Específicamente en sarampión, mediante la profilaxis en los contactos y en las personas con inmunodepresión y contribuyendo a la eliminación de la "ventana de susceptibilidad en los lactantes" que está presente cuando los títulos de anticuerpos maternos disminuyen (Plempner y Snyder 2015).

El desarrollo y evaluación de antivirales podría emplearse de acuerdo con la FDA como fármacos o suplementos alimenticios, que prometan un beneficio importante con respecto a la terapia existente contra enfermedades virales graves o incapacitantes de alta morbilidad o bien podría ser una adición útil a las opciones profilácticas disponibles proporcionando una plataforma combinada contra el sarampión y de esta forma alcanzando la meta propuesta por la OMS de erradicación de este agente infeccioso (Plempner y Snyder 2015).

Con respecto al último punto descrito, la investigación y desarrollo de antivirales eficaces en la contención de brotes de sarampión es una herramienta importante para lograr la erradicación de la enfermedad.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El sarampión es una enfermedad que aunque ha existido por muchos años ha tomado gran importancia debido a los recientes brotes ocurridos; tomando en cuenta esto, la OMS ha decidido establecer un plan estratégico para la erradicación de esta enfermedad. Una combinación de enfoques profilácticos (vacunas) y terapéuticos como el uso de antivirales podrían contribuir a la erradicación de este virus y al control de muchos otros virus de gran importancia en salud.

Los antivirales facilitan el rápido control de los brotes virales, suprimiendo la enfermedad o reduciendo la severidad de esta; en la actualidad existen muy pocos antivirales en el mercado, y los que existen actúan contra muy limitadas infecciones virales, la mayoría son tóxicos, muy costosos y por tanto de difícil acceso para la población de países en vías de desarrollo. Por lo anterior mencionado, la exploración de nuevas sustancias como candidatos para fármacos antivirales es fundamental.

México es un país con una gran biodiversidad, siendo uno de los países con mayor número de especies de algas de Latinoamérica. Uno de los principales objetivos de la explotación de estos recursos algales es la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos con aplicaciones nutraceuticas y farmacéuticas.

Diferentes compuestos químicos han sido aislados a partir de las algas, incluyendo polisacáridos sulfatados y polifenoles; compuestos que han sido ampliamente estudiados anteriormente por su actividad antiviral.

En el presente trabajo se estudió la actividad antiviral de polisacáridos sulfatados provenientes de algas de litorales mexicanos contra el virus de Sarampión cepa Edmoston y su actividad sinérgica con ribavirina y con polifenoles provenientes de las mismas algas.

#### **4. HIPÓTESIS**

Los polisacáridos sulfatados de algas de litorales mexicanos ejercen una actividad antiviral contra el virus de Sarampión cepa Edmoston y una actividad sinérgica al combinar polisacáridos sulfatados de diferentes algas, PS con la ribavirina o PS con polifenoles provenientes de las mismas fuentes a concentraciones no citotóxicas.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general**

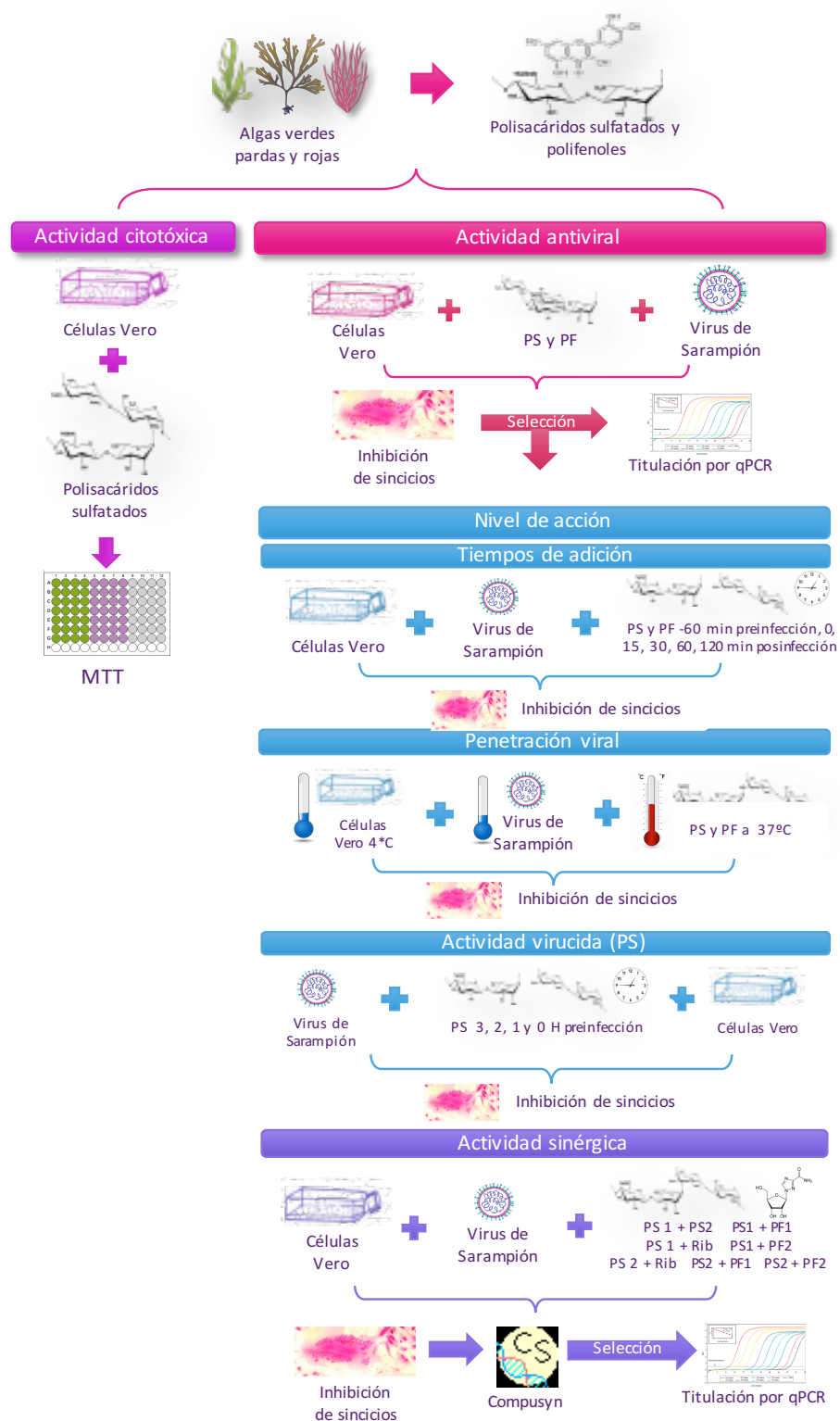
Evaluar la actividad antiviral y mecanismo de acción de polisacáridos sulfatados de algas de litorales mexicanos, y su actividad sinérgica entre PS de diferentes algas, polifenoles algales y ribavirina, contra el virus del Sarampión.

### **5.2 Objetivos específicos**

1. Determinar la citotoxicidad de los polisacáridos sulfatados y polifenoles de algas rojas, verdes y pardas (presentes en los litorales mexicanos).
2. Determinar el índice de selectividad (IS) de los compuestos contra la cepa vacunal Edmoston del virus de Sarampión “*in vitro*” y seleccionar aquellos que presenten un índice de selectividad al 50% ( $IS \geq 1000$ ).
3. Determinar si la acción antiviral ejercida por los compuestos seleccionados con alto IS ocurre directamente inhibiendo al virión, durante la adsorción o entrada del virus a la célula, durante etapas posteriores a la entrada y/o inhibiendo la formación de sincicios.
4. Determinar si existe un efecto antiviral sinérgico de los compuestos seleccionados al combinarse entre si, en contra de la cepa Edmoston de Sarampión.
5. Determinar si existe un efecto antiviral sinérgico de los compuestos seleccionados y la rivabirina, en contra de la cepa Edmoston de Sarampión.

## 7. MATERIAL Y MÉTODOS

### 7.1 Diseño experimental



**Figura 11.** Estrategias de experimentación llevadas a cabo en este estudio

## 6.1 Preparación de los extractos

### 6.1.1 Algas mexicanas usadas en el estudio

Las macroalgas utilizadas en este estudio fueron recolectadas de las costas de México: tres algas pardas de Baja California (*Macrocystis pyrifera*, *Eisenia arborea*, *Pelvetia compressa*), un alga verde de Baja California Sur (*Ulva intestinalis*) y un alga roja cultivada en Yucatan (*Solieria filiformis*), las cuales fueron proporcionadas por el Programa de Maricultura de la Facultad de Ciencias Biológicas bajo la dirección de la Dra. Elizabeth Cruz Suarez.

*Macrocystis pyrifera* (Linnaeus) C. Agardh se colectó en la Bahía de Ensenada (Manto Jantay) delante de la playa Salsipuedes (31,983 a 116,815), en enero de 2013. *Eisenia arborea* J. E. Areschoug y *Pelvetia compressa* (J. Agardh) De Toni fueron colectadas en la Zona Escalera, al norte de Punta China (31,520 a 116,650) de diciembre 2014 a enero 2015. El alga verde *Ulva intestinalis* (Linnaeus) se recogió del canal de drenaje del agua de la camaronera Gran Mar, en la costa oeste de Baja California (24,434 a 111,584) en agosto 2014.

*Solieria filiformis* (Kützinger) P. W. Gabrielson, se obtuvo de la estación de acuicultura marina Telchac del CINVESTAV, en Yucatán (México), el alga se cultiva periódicamente cada bimestre en tanques semiabiertos como parte de un Sistema integrado de acuicultura multitrófica. La muestra utilizada para este estudio procede de un lote cultivado de abril a mayo de 2014.

Una vez colectadas, las muestras de algas pardas y verdes se lavaron en agua de mar para eliminar arena, conchas y epibiontes, y se secaron a la sombra, mientras que el alga roja cultivada se lavó con agua fresca y se secó en un horno a 60 °C. Antes de la extracción, las muestras fueron cortadas en pequeños trozos de 2-3 cm y se molieron hasta que pasaran por un tamiz de 0.5 mm (Turbomolino Pulvex200).



### **6.2.2 Extracción y purificación de polisacáridos sulfatados.**

Se tomaron 10g de polvo de alga y se lavaron con agua destilada, posteriormente se secaron a temperatura ambiente durante toda la noche. Al polvo previamente lavado se le adicionaron 200 mL de etanol 50% v/v y se sonicaron las muestras durante 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se colocaron en un baño maría a 70°C durante dos horas.

Las muestras se centrifugaron durante 15 min (2500 rpm). El sedimento se utilizó para la extracción de polisacáridos de acuerdo con el procedimiento descrito previamente (Tako et al. 2000, Ale et al. 2012). Posteriormente, se añadieron 200 mL de HCl 0.1 al sedimento y se calentó durante 1 hora a temperatura de ebullición, las muestras se centrifugaron a 3500 RPM durante 10 minutos. Los sobrenadantes se recuperaron y se añadió etanol absoluto (4:1) para la precipitación de los polisacáridos. Una vez precipitados, los polisacáridos se separaron de la fase acuosa por medio de centrifugación a 3500 RPM durante 10 minutos; el sobrenadante se desechó y el sedimento se lavó tres veces con etanol al 96% para eliminar pigmentos residuales. Finalmente se resuspendió el sedimento en una cantidad mínima de agua destilada durante una diálisis de 72 horas con agitación. El producto dializado se precipitó con etanol absoluto (4:1). Los extractos de polisacáridos se liofilizaron y se pesaron para calcular su rendimiento.

Los extractos se resuspendieron en medio D-MEM/F12 por separado para tener un stock de 2500 µg/mL, posteriormente se esterilizaron con un filtro de 0.45 µm y se mantuvieron en refrigeración hasta su uso. A partir del stock se realizaron las diluciones en medio D-MEM/F12 para obtener las concentraciones seleccionadas para cada ensayo.

### **6.2.3.1 Extracción y purificación de polifenoles.**

Se pesó 1 gr de polvo de alga en un matraz Erlenmeyer de 125 ml, a continuación se agregaron 20 ml de etanol 50% v/v, se colocaron en el sonicador (marca VWR 50-60 HZ) durante media hora a temperatura ambiente, y posteriormente se realizó la extracción en el shaker (baño de agua) a 70 °C durante 2 horas con agitación constante, una vez transcurrido el tiempo, la muestra se dejó enfriar a temperatura ambiente y se filtró para separar los sólidos del alga y el sobrenadante. Se evaporó el etanol de la muestra con nitrógeno y posteriormente los extractos fueron almacenados a 4°C para ser procesadas al día siguiente para su liofilización. Posterior a su liofilización los polifenoles fueron resuspendidos en medio DMEM como se describió previamente para los polisacáridos sulfatados.

## **6.3 Evaluación del efecto citotóxico de los compuestos.**

### **6.3.1 Cultivo celular**

Las células Vero (ATCC® CCL-81™) fueron cultivadas en medio DMEM F-12 (Life technologies) suplementado con 5% de suero fetal bovino (FBS), y 1% de antibiótico, en frascos de 25 cm<sup>3</sup>, con 5 mL de medio a 37°C, en atmosfera de aire con 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad relativa. Las células fueron transferidas a otro frasco cuando alcanzaron un 90% de confluencia.

### **6.3.2 Determinación del efecto de los polisacáridos sulfatados sobre la viabilidad celular**

Se realizó empleando el método de reducción del MTT [Bromuro de 3-(4, 5-dimetil tiazol- 2- yl)- 2, 5- difenil tetrazolio] introducido por Mossman y preparando el reactivo a una concentración de 5mg/mL en PBS (Buffer de fosfatos-salina). Las células con 80% de confluencia fueron tripsinizadas, contadas en la cámara de Neubauer y transferidas a placas de microtitulación de 96 pozos con fondo plano (15000 células por

pozo); las células se incubaron a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub> hasta obtener una confluencia de 80-90%. Una vez confluentes las células, se les agregó 100 µL de los compuestos por pozo a diferentes concentraciones: 0.1, 1, 10, 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 µg/ml. Se incubó durante 48 h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente se les eliminó el medio y se agregaron 22 µl de la solución de MTT (0.05 g/ml) a cada pozo y se incubaron a 37°C durante 1.5 horas. Se les eliminó el MTT y se reemplazó por 100 µL de DMSO (dimetilsulfóxido) y se incubaron durante 8 minutos, posteriormente se midió la absorbancia a 450 nm en el lector de ELISA. Se calcularon los porcentajes de supervivencia relativas a las células control no tratadas y se calcularon las concentraciones citotóxicas al 50% (CC<sub>50</sub>). La valoración de todos los compuestos se realizó empleando tres pozos con cada concentración evaluada y el ensayo se realizó por triplicado.

#### **6.4 Evaluación del efecto antiviral de los compuestos**

##### **6.4.1 Propagación del virus de Sarampión en células Vero**

El virus sarampión cepa vacunal Edmoston “MeV” (ATCC VR-24 Lote: 62653191) fue propagado en células Vero. Las células fueron cultivadas en botellas de 75cm<sup>2</sup> de superficie, una vez que alcanzaron el 80% de confluencia, se les retiró el medio y se reemplazó con medio DMEM-F12 sin suplementos ni antibióticos adicionando 100 ul de la cepa vacunal. Se incubó la caja a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub> por 72 horas, pasado el tiempo de incubación y una vez observado el daño citopático causado por el virus se transfirió la caja al congelador (-80 °C) donde se mantuvo por 24 horas. Posteriormente se descongelaron y se transfirió el volumen de la caja a tubos de 1.5 mL para su centrifugación a 1000rpm por 3 minutos. El sobrenadante fue recuperado para posteriormente filtrarse y realizar alícuotas del filtrado. Las alícuotas se guardaron en el congelador hasta su posterior uso.

#### **6.4.2 Obtención del título viral por TCID<sub>50</sub>**

En placas de 12 pozos se sembraron 70,000 células Vero y se incubaron a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> hasta obtener 80 % de confluencia, posteriormente fueron infectadas con diluciones seriadas de MeV; se incubaron durante 1 h a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>, se retiró el inóculo y se reemplazó con 500 µL de DMEM, posteriormente se incubó por 72 h en ambiente controlado, al término del periodo de incubación las células se fijaron con metanol-acetona 1:1 durante 30 min. y se tiñeron con cristal violeta al 1% para determinar el número de sincicios por dilución. Se observó la presencia/ausencia de sincicios por pozo para obtener el título viral por el método de Reed y Muench.

#### **6.4.3 Ensayo de Inhibición de sincicios**

Las células Vero se colocaron en placas de 12 pozos (70, 000 células por pozo) y se incubaron a 37° C y 5 % de CO<sub>2</sub> hasta obtener 80% de confluencia. Posteriormente se les removió el medio y se les agregaron los extractos a diferentes concentraciones (0.01, 0.1, 1 y 5 µg /mL: concentración final) en un volumen de 500 µL de medio DMEM por cada pozo (tres pozos por dilución), al mismo tiempo que se infectaron con 500 µL de MeV ( $1 \times 10^{3.5}$  TCID<sub>50</sub>) y se dejaron incubar por 1 h a 37 °C, después del tiempo de incubación se les retiró el inóculo y se les agregaron 1mL del polisacárido en medio DMEM a las diferentes concentraciones. Las placas se incubaron hasta que el control viral presentó el efecto citopático, una vez ocurrido esto se retiró el medio de los pozos, las células se fijaron con metanol-acetona 1:1 por 30 minutos y se tiñeron con cristal violeta 0.1%. Se realizó el conteo total de sincicios y se calculó el porcentaje relativo al control viral de cada una de las concentraciones. Se realizó una curva dosis-respuesta con el objetivo de calcular la concentración inhibitoria al 50% (CI<sub>50</sub>) de cada polisacárido. El índice de selectividad (IS=CC<sub>50</sub>/CI<sub>50</sub>) de cada polisacárido fue calculado, los polisacáridos con el mayor IS se seleccionaron para los experimentos subsecuentes.

#### 6.4.4 Confirmación de la actividad antiviral por determinación del título viral por RT-qPCR.

Las células Vero fueron tratadas con los polisacáridos seleccionados a las concentraciones más efectivas (1 y 5 µg/mL) e infectadas con MeV ( $1 \times 10^{3.5}$  TCID<sub>50</sub>) como se describió previamente. Las placas se incubaron hasta que el control viral presentó el efecto citopático, posteriormente se retiró el medio y se realizó una extracción de RNA con el reactivo RNazol® RT (MRC Inc., USA). La transcripción reversa fue realizada por medio de random primers utilizando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, USA). Un fragmento de 95 nucleótidos del gen N del virus fue amplificado utilizando primers específicos (MeVF: 5' GAGGGTCAAACAGAGTCGAG 3', MeVR: 5' CGGTTGGAAGATGGGCAG 3'). La qPCR se realizó utilizando el kit SensiFAST™ SYBR® No-ROX (BIOLINE, USA) y utilizando el termociclador Chromo4™ Real-Time PCR Detector (Bio-Rad, USA) con el siguiente programa: 95°C por 2min, seguido de 50 ciclos de 95°C por 2seg, 60°C por 10seg y 72°C por 20seg. La curva estándar se obtuvo graficando el valor Ct (en inglés threshold cycle) de cada una de las diluciones contra el logaritmo del número de copias del gen N de MeV. Cada punto de la curva estándar se corrió por triplicado. Para validar la cuantificación absoluta se corrió en tres ensayos independientes.

La estimación del número de copias del gen N de los estándares utilizados para la construcción de la curva estándar se hizo de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Número de copias de gen} = \frac{(\text{Cantidad de transcrito})(\# \text{ de Avogadro})}{(\# \text{ pares de bases})(1 \times 10^3)(340)}$$

Donde la cantidad de transcrito de RNA se expresa en mg, el número de avogadro corresponde a  $6.02 \times 10^{23}$ , pb al número de pares de bases del transcrito,  $1 \times 10^3$  es un factor de conversión para convertir de g a mg y 340 es el peso molecular promedio de un nucleótido en una hebra sencilla de RNA. Se determinó el título viral en cada una de los tratamientos por la interpolación del valor Ct en la curva. Se calcularon los porcentajes de inhibición relativos al control viral para comparar el resultado con el previamente obtenido por el ensayo de inhibición de sincicios.

## **6.5 Evaluación del nivel de acción de los compuestos**

### **6.5.1 Ensayo de Inhibición del Efecto Citopático de los Agentes Antivirales a Diferentes Tiempos de Infección**

Se colocaron 70,000 células Vero por pozo en placas de 12 y se incubaron a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> hasta obtener 80 de confluencia. Se eliminó el medio de los pozos y se adicionaron los compuestos seleccionados de manera individual, a una concentración de 5 µg /mL, a diferentes tiempos de la infección de MeV TCID<sub>50</sub> (60 min preinfección, 0, 15, 30, 60 y 120 min postinfección) y se incubaron a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. Se retiró el inóculo del virus después del tiempo establecido para la adsorción (1 hora), una vez terminado el tiempo de incubación de todos los tratamientos (60 min preinfección, 0, 15, 30, 60 y 120 min postinfección) y se incubaron a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. Se retiró el inóculo del virus después del tiempo establecido de incubación para la absorción (1 hora, al mismo tiempo que el tratamiento), una vez terminado el tiempo de incubación de todos los tratamientos, los polisacáridos fueron reemplazados con medio DMEM y se incubaron las placas en un ambiente controlado, a 37° C con 5% de CO<sub>2</sub>. Después del periodo de incubación las monocapas se fijaron con metanol-acetona 1:1 por 30 minutos y se tiñeron con cristal violeta 1% para el subsecuente conteo de sincicios con el que se determinó el porcentaje relativo de sincicios por tratamiento con respecto al control viral. Se realizaron 3 ensayos independientes por triplicado (N=9).

### **6.5.2 Ensayo de inhibición de la penetración viral**

La penetración viral de MeV en las células Vero fue evaluada según el método reportado por Huang y Wagner con algunas modificaciones (Huang y Wagner 1964, Elizondo-Gonzalez et al. 2012). Cuando un virus envuelto infecta la célula a 4°C, el virus puede unirse a los receptores celulares, pero las bajas temperaturas previenen la entrada; lo que es importante para discriminar entre un efecto antiviral a nivel de adsorción o a nivel de entrada por parte de los compuestos seleccionados.

Las células Vero fueron cultivadas en placas de 12 pozos y con una confluencia del 80% fueron pre enfriadas a 4°C por 3 horas, posteriormente se infectaron con el virus TCID<sub>50%</sub> y se incubaron a 4°C por 1 h en la ausencia de los compuestos. Después del tiempo de incubación, las células fueron lavadas 3 veces con PBS para posteriormente agregar los compuestos seleccionados a una concentración de 5 µg /mL. Las células se incubaron a 37°C por 1 hora, después de la incubación fueron lavadas con un buffer de citratos 40mM (pH 3.0) para inactivar los virus que no penetraron la célula. Después de los lavados, el buffer fue reemplazado por medio de cultivo DMEM-F12 y las células se incubaron por 72 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Pasado el tiempo de incubación las células se fijaron con metanol acetona 1:1 por 30 minutos y se tiñeron con cristal violeta 1% para poder visualizarlas en el microscopio invertido y determinar el porcentaje relativo de sincicios de cada tratamiento con respecto al control viral. Se realizaron 3 ensayos independientes por triplicado N=9.

### **6.5.3 Ensayo virucida**

El efecto virucida se evalúa con el objetivo de dilucidar si el efecto inhibitorio observado se debe a la interacción directa de los compuestos seleccionados con la partícula viral. Los compuestos (5 µg/mL) se incubaron con el virus TCID<sub>50%</sub> a diferentes tiempos (1, 2 y 3 h). Posteriormente cada mezcla de virus y compuesto se agregó a las células por una hora (adsorción), se retiraron pasado este tiempo y se incubaron por 72h a 37°C. Pasado el tiempo de incubación se obtuvo el porcentaje relativo de sincicios con respecto al control. Se realizaron 3 ensayos independientes y por triplicado N=9.

## **6.6 Evaluación del efecto sinérgico antiviral de los compuestos seleccionados**

El efecto sinérgico potencial de los compuestos seleccionados sobre la infección de MeV fue evaluado por medio de ensayos de inhibición de sincicios. Se probaron en total 33 combinaciones, que corresponden a 3 grupos diferentes, combinaciones de PSs, combinaciones de PS y PF, y combinación de PS y ribavirina.

Para el primer grupo (combinaciones de PSs), cada PS fue probado con su correspondiente valor  $CI_{75}$ ,  $CI_{50}$  y  $CI_{25}$  para tener un número total de 9 combinaciones. Para el segundo grupo (combinaciones de PS y PF), cada PS y PF fue combinado con su correspondiente valor  $CI_{25}$  y  $CI_{50}$ , teniendo un total de 16 combinaciones. Por último, para el tercer grupo (combinaciones de PS y ribavirina), cada PS y la ribavirina fue combinado con su correspondiente valor  $CI_{25}$  y  $CI_{50}$ , para tener un total de 8 combinaciones distintas.

Se realizaron 3 ensayos independientes y se calculó el porcentaje de inhibición de cada combinación por medio del ensayo de inhibición de sincicios como se ha descrito previamente.

El efecto sinérgico de los compuestos se determinó mediante el cálculo de un índice de combinación (IC) descrito previamente por Chou (Chou 2010) y con la ayuda del software CompuSyn. El IC se calcula a partir de la datos como una medida de la interacción entre los fármacos. Valores IC inferiores a 0.9 indican sinergia, valores de IC de 0.9 a 1.1 indican un efecto aditivo, y un IC superior a 1.1 indica antagonismo. Las combinaciones con efecto antiviral sinérgico fueron seleccionadas y se confirmó el efecto inhibitorio de estas combinaciones por medio de ensayos de qPCR tal como se describe anteriormente.

## **6.7 Análisis estadístico**

Los datos se analizaron con el programa SPSS 20. Todas las variables fueron realizadas por triplicado para cada experimento y repetido al menos tres veces ( $N=9$ ). Los valores  $CC_{50}$  y  $CI_{50}$  fueron determinados por el análisis de regresión Probit. Se realizó un análisis de varianza de un factor seguido de un análisis de Dunnet. Análisis de Varianza de dos factores, seguidos de un análisis Tukey fueron realizados al comparar distintas técnicas. Valores de  $*p<0.05$  fueron considerados como estadísticamente significativos.

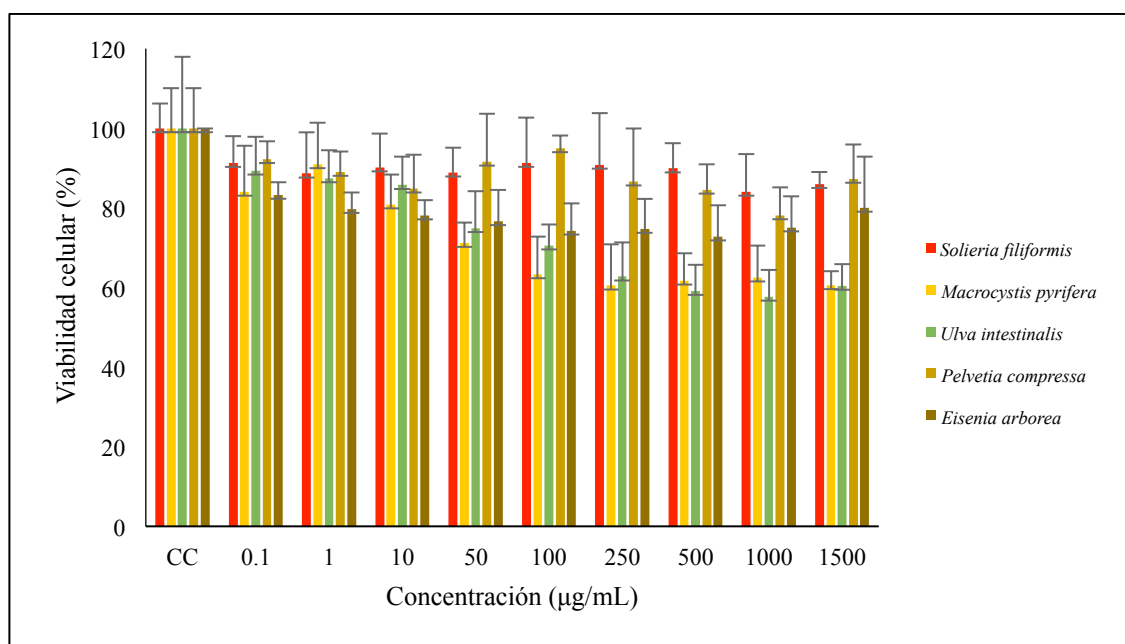


## 7. RESULTADOS

### 7.1 Efecto Citotóxico de los Polisacáridos Sulfatados

Para determinar la citotoxicidad de los polisacáridos sulfatados extraídos de las algas mexicanas *Macrocystis pyrifera*, *Eisenia arborea*, *Pelvetia compressa*, *Ulva intestinalis* y *Solieria filiformis*, se realizaron ensayos de viabilidad celular en células Vero mediante la técnica colorimétrica MTT tal cual se menciona en la metodología. Se realizaron tres ensayos por triplicado para cada uno de los PS y se calculó la  $CC_{50}$  mediante regresión lineal (Probit) con el programa SPSS 20.

Se determinó que los polisacáridos sulfatados de todas las algas poseen una  $CC_{50}$  >1500  $\mu\text{g/ml}$  (Figura 12). Los polisacáridos sulfatados de las algas *Eisenia arborea*, *Pelvetia compressa*, y *Solieria filiformis*, aún a una concentración de 1500  $\mu\text{g/ml}$  mostraron un alto porcentaje de viabilidad (80%-87%).



**Figura 12. Efecto citotóxico de los polisacáridos sulfatados sobre la viabilidad celular.** Las columnas de la izquierda muestran la absorbancia de células Vero sin tratar y tomadas como 100% de viabilidad (control), seguidas de las células tratadas con concentraciones de 0.1 a 1500  $\mu\text{g/mL}$  de los compuestos

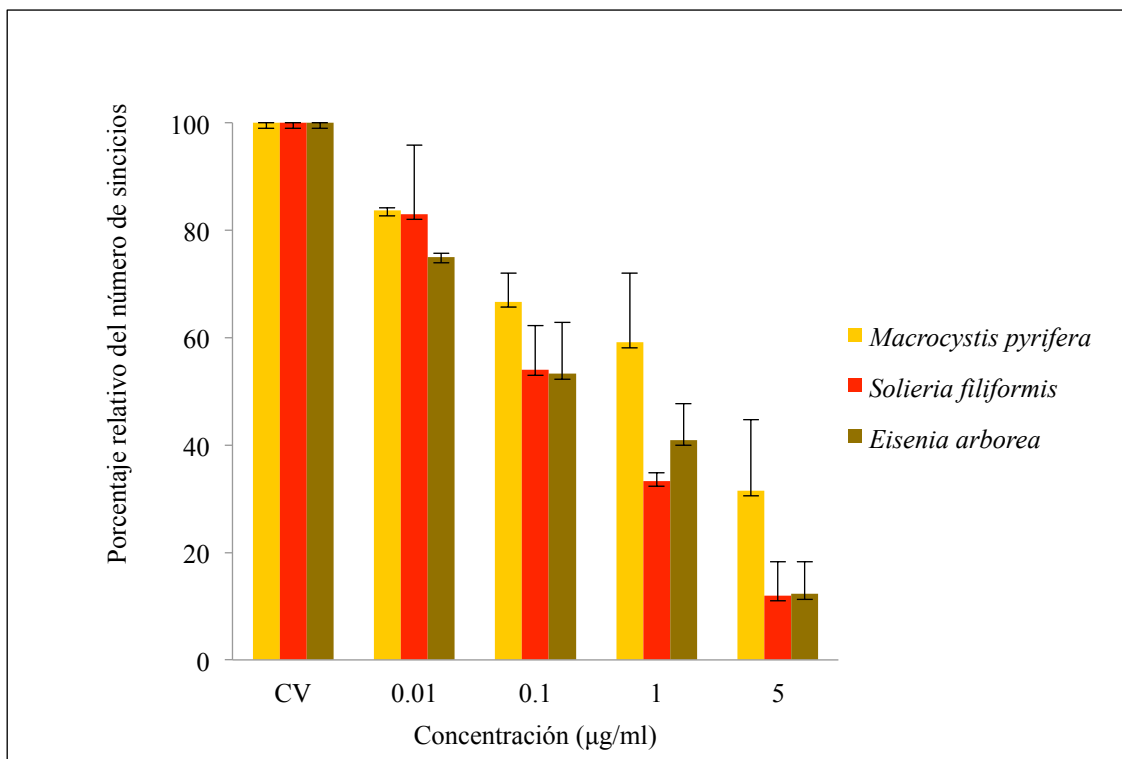
## **7.2 Efecto Antiviral de Compuestos de Algas Mexicanas sobre el Virus de Sarampión cepa Edmoston**

### **7.2.1 Obtención del Título de Sarampión cepa Edmoston (MeV) por Dosis Infectiva en Cultivo de Tejidos al 50% (TCID<sub>50%</sub>)**

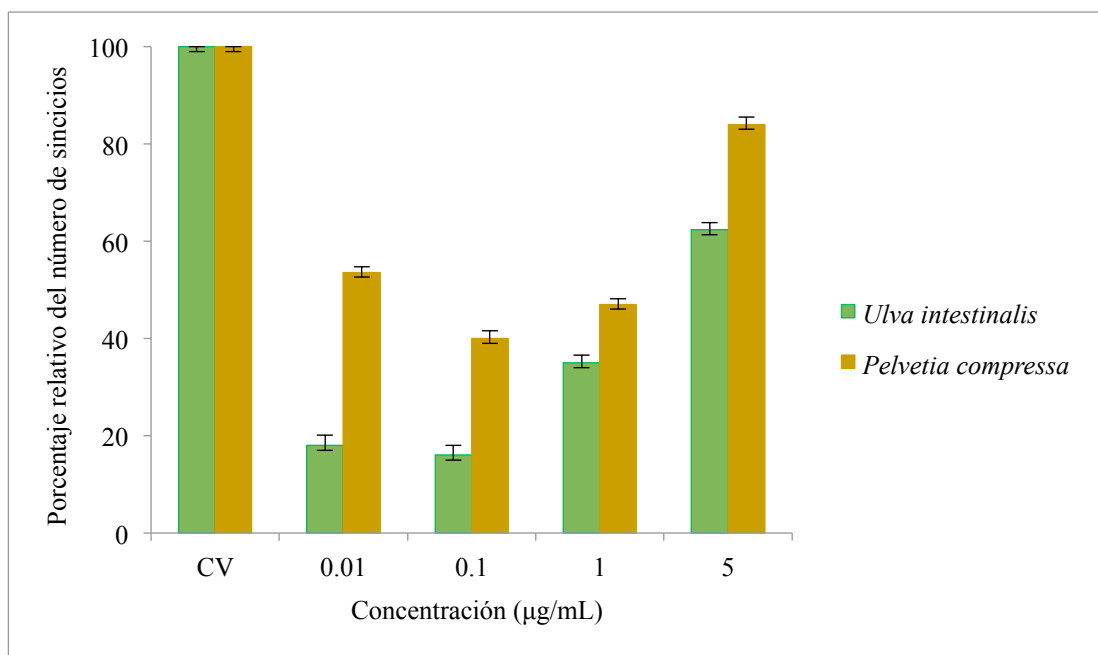
Para obtener el título viral de nuestro stock de MeV, se infectaron células Vero con diluciones seriadas del virus; a las 48 hrs se realizó la técnica de inhibición de sincicios como se describe en material y métodos. El título se determinó mediante el método de Reed and Muench; se expresa como 50% de las dosis infectante, que es el recíproco de la dilución del virus que produce el efecto en el 50% de las células infectadas, dando como resultado un título viral de MeV en  $10^{3.5}$  TCID<sub>50%</sub>/mL.

### **7.2.2 Evaluación del Efecto de los Polisacáridos Sulfatados sobre la Formación de Sincicios Producidos por MeV**

Los paramixovirus como el virus de Sarampión tienen la capacidad de diseminarse en forma intercelular por fusión de las células infectadas con células no infectadas por medio de su glicoproteína de fusión F, lo que origina la formación de células gigantes multinucleadas denominadas sincicios. Las células Vero cultivadas fueron tratadas con diferentes dosis de los polisacáridos sulfatados y se infectaron con MeV. Se analizó la inhibición de la formación de sincicios como se indica en material y métodos. Todos los polisacáridos sulfatados probados redujeron el número de sincicios de las células infectadas con MeV, sin embargo, los extractos de *Eisenia arborea* y *Solieria filiformis* mostraron tener la mejor actividad antiviral de los 5 extractos probados (con un porcentaje de inhibición de sincicios del 87.7% y 88% a 5 µg/mL, respectivamente) (Figura 13). La actividad antiviral de los polisacáridos sulfatados obtenidos de las algas *Pelvetia compressa* y *Ulva intestinalis* no siguió una curva dosis-respuesta típica a comparación de los otros 3 polisacáridos probados (Figura 14). Se calculó la CI<sub>50</sub> de cada tratamiento por medio de la regresión lineal (Probit) con el programa SPSS 20 (Tabla 6).



**Figura 13.** Efecto de los polisacáridos sulfatados obtenidos de las algas *Macrocyctis pyrifera*, *Solieria filiformis* y *Eisenia arborea* en la formación de sincicios por MeV. Las columnas de la izquierda muestran el porcentaje de sincicios en células Vero sin tratamiento (Control viral), las cuales fueron tomadas como 100% de porcentaje relativo de sincicios, continuando con las células infectadas y tratadas con 0.1, 1, 1, y 5 µg/ml de los compuestos.



**Figura 14.** Efecto de los polisacáridos sulfatados obtenidos de las algas *Pelvetia compressa* y *Ulva intestinalis* en la formación de sincicios por MeV. Las columnas de la izquierda muestran el porcentaje de sincicios en células Vero sin tratamiento (Control viral), las cuales fueron tomadas como 100% de porcentaje relativo de sincicios, continuando con las células infectadas y tratadas con 0.1, 1, 1, y 5 µg/ml de los compuestos.

### 7.2.3 Selección de los Compuestos de Algas Mexicanas con Mejor Actividad Antiviral

Los compuestos con un mejor índice de selectividad o índice terapéutico, fueron seleccionados para los experimentos subsecuentes. El índice de selectividad (IS) nos permite evaluar el potencial de un compuesto como antiviral al relacionar la dosis citotóxica ( $CC_{50}$ ) y la dosis inhibitoria ( $CI_{50}$ ), por lo cual se calculó el IS para cada uno de los compuestos evaluados. El mayor índice de selectividad se obtuvo con los polisacáridos sulfatados de *Eisenia arborea* y *Solieria filiformis*, con un  $IS > 5454.54$  y  $>1522.84$  respectivamente. Los extractos de *Pelvetia compressa* y *Macrocystis pyrifera* demostraron tener  $IS >1500$ , mientras que *Ulva intestinalis* fue el menos selectivo con un  $IS >416.7$ . Por lo anterior, se decidió seleccionar a los polisacáridos sulfatados de *Eisenia arborea* y *Solieria filiformis* para los experimentos subsecuentes de inhibición de carga viral por qPCR, evaluación del mecanismo de acción y efecto combinado.

**Tabla 6.** Efecto citotóxico, actividad antiviral e índice de selectividad de los polisacáridos sulfatados.

<b>Alga<sup>a</sup></b>	<b>CC<sub>50</sub> (µg/mL)<sup>b</sup></b>	<b>CI<sub>50</sub> (µg/mL)<sup>c</sup></b>	<b>IS<sup>d</sup></b>
<i>Macrocystis pyrifera</i>	>1500	1.00	>1500
<i>Eisenia arborea</i>	>1500	0.275	> 5454.54
<i>Pelvetia compressa</i>	>1500	1.00	>1500
<i>Ulva intestinalis</i>	>1500	3.6	>416.7
<i>Solieria filiformis</i>	>1500	0.985	>1522.84

<sup>a</sup> Alga usada para la extracción de los polisacáridos sulfatados. <sup>b</sup> Concentración (µg/mL) que redujo la viabilidad de las células Vero en un 50%. <sup>c</sup> Concentración probada que inhibió el número de sincicios de MeV en células Vero en un 50%. <sup>d</sup> Índice de selectividad calculado.

La citotoxicidad y actividad antiviral de los polifenoles extraídos de algas mexicanas fue determinada por el Q.B.P. Miguel Eduardo Pérez, estos resultados fueron considerados en las posteriores evaluaciones del efecto combinado y del nivel de acción de los compuestos seleccionados (Tabla 7).

**Tabla 7.** Efecto citotóxico, actividad antiviral e índice de selectividad de los polifenoles.

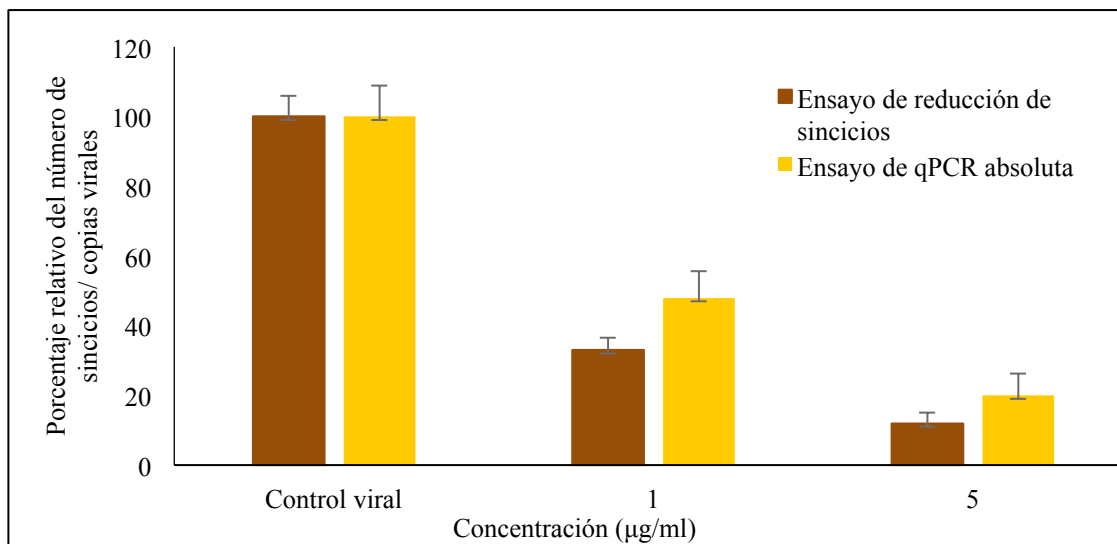
<b>Alga<sup>a</sup></b>	<b>CC<sub>50</sub> (µg/mL)<sup>b</sup></b>	<b>CI<sub>50</sub> (µg/mL)<sup>c</sup></b>	<b>IS<sup>d</sup></b>
<i>Eisenia arborea</i>	>1500	2.6	> 577
<i>Solieria filiformis</i>	>1500	0.4	>3750.84

<sup>a</sup> Alga usada para la extracción de los polifenoles. <sup>b</sup> Concentración (µg/mL) que redujo la viabilidad de las células Vero en un 50%. <sup>c</sup> Concentración probada que inhibió el número de sincicios de MeV en células Vero en un 50%. <sup>d</sup> Índice de selectividad calculado.

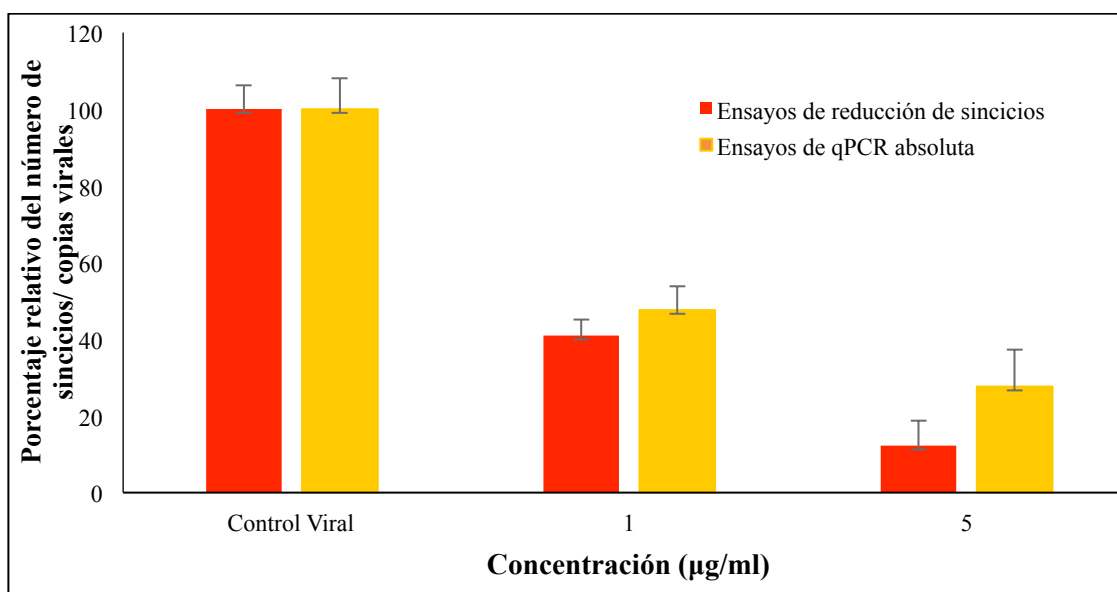
#### **7.2.4 Evaluación del efecto de los Polisacáridos Sulfatados de *Eisenia arborea* y *Solieria filiformis* sobre la carga viral de MeV por RT-qPCR**

Para confirmar la actividad antiviral de los polisacáridos sulfatados seleccionados (*Eisenia arborea* y *Solieria filiformis*), las células Vero fueron tratadas con los PS a las concentraciones más efectivas (1 y 5 µg/mL) e infectadas con MeV como se describió previamente, pasado el tiempo de incubación se realizó la extracción de RNA de las células y se sintetizó el DNAc. Se realizó la cuantificación absoluta por medio de qPCR del gen N de MeV en los controles virales y tratamientos. Se confirmó el efecto de los PS de *Eisenia arborea* (Figura 15) y *Solieria filiformis* (Figura 16), en la infección por MeV por medio de la reducción del título viral en comparación con el control.

Al comparar el resultado obtenido por la técnica de qPCR con el obtenido por la técnica de inhibición de sincicios, observamos variaciones no significativas entre la inhibición de sincicios e inhibición de carga viral, 33% en el porcentaje de sincicios y 48% en el porcentaje de copias virales a 1 µg/mL de *E. arborea* y 12% y 20% a 5 µg/mL, respectivamente. Del mismo modo no se observó variación significativa para los PS de *Solieria filiformis* (40.97% en el porcentaje de sincicios y 47.6% en el porcentaje de copias virales a 1 µg/mL y 12.26% y 27.66% a 5 µg/mL, respectivamente).



**Figura 15.** Confirmación de la actividad antiviral de los PS de *Eisenia arborea*. La actividad antiviral de los PS de *E. arborea* fueron probados en su mayor concentración inhibitoria por los ensayos de reducción de sincicios y ensayos de qPCR absoluta.



**Figura 16.** Confirmación de la actividad antiviral de los PS de *Solieria filiformis*. La actividad antiviral de los PS de *S. filiformis* fueron probados en su mayor concentración inhibitoria por los ensayos de reducción de sincicios y ensayos de qPCR absoluta.

## 7.3 Evaluación del Nivel de Acción de los Compuestos Seleccionados

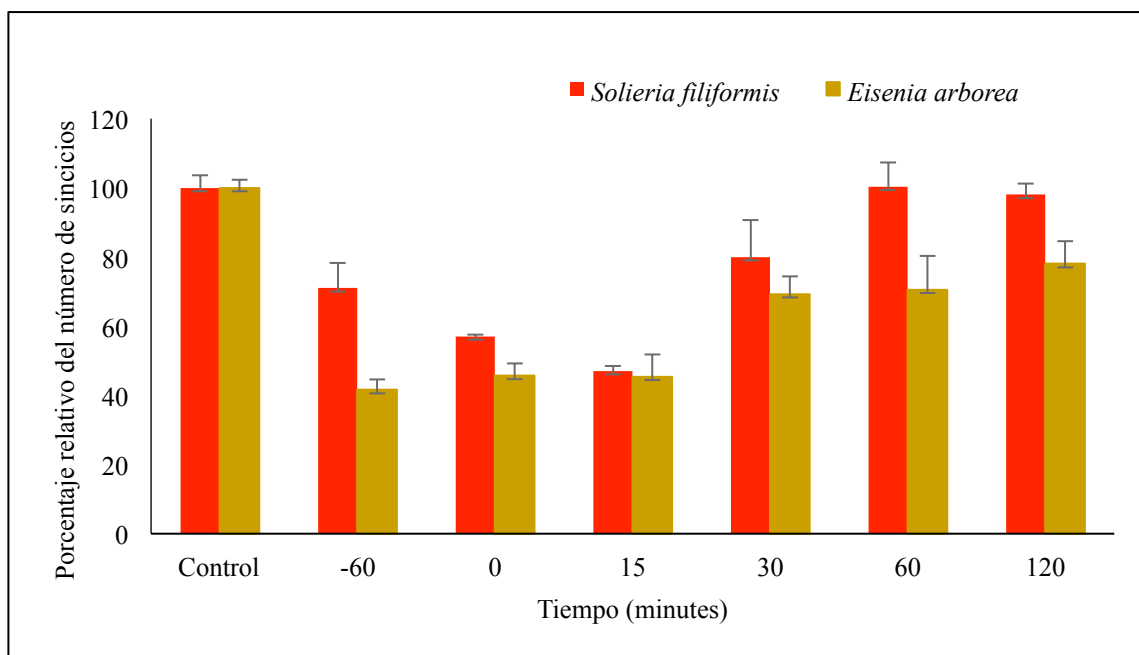
### 7.3.1 Inhibición de Sincicios de los Compuestos a Diferentes Horas de la Infección

Para determinar la etapa del ciclo viral en la cual los PS y PF de *Eisenia arborea* y *Solieria filiformis* actúan contra MeV, se realizaron ensayos de tiempo de adición. Se infectaron células Vero y se trataron con 5 µg/mL de los PS o PF a diferentes horas de la infección (60 min preinfección, 0, 15, 30, 60 y 120 min postinfección), posteriormente se analizó la inhibición de formación de sincicios.

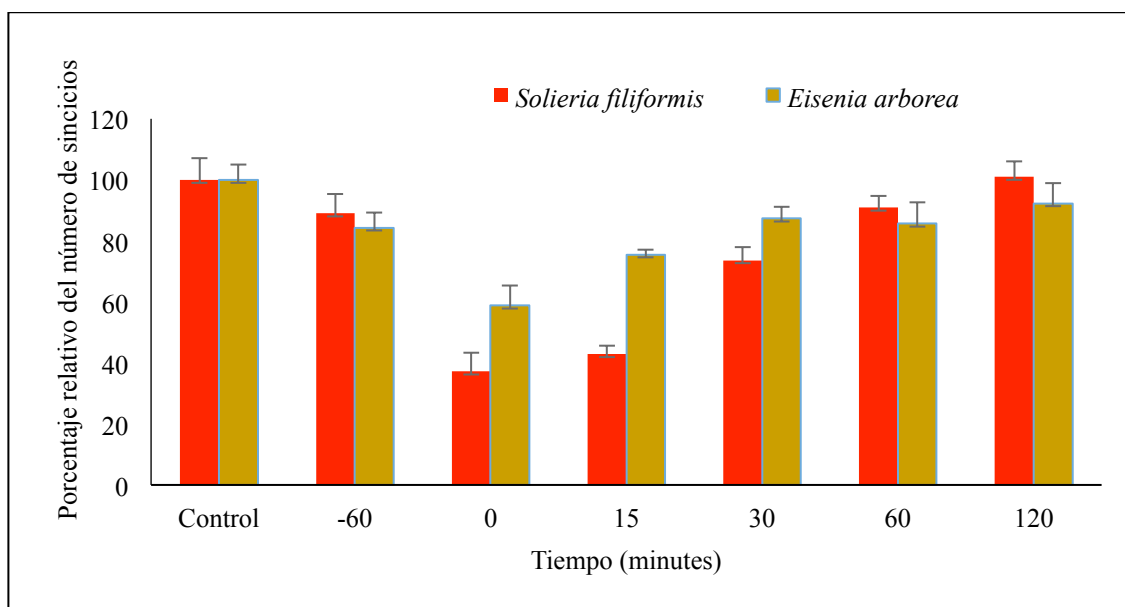
El porcentaje de inhibición presentado fue 58% al ser tratadas las células con 5 µg/ml de los PS de *Eisenia arborea* una hora antes de la infección, y se redujo a 55%, cuando fueron tratadas a los 0 y 15 minutos de la infección por el virus. (Figura 15). Con los PS de *Solieria filiformis*, los mayores porcentajes de inhibición de sincicios se obtuvieron a los 0 y 15 minutos postinfección (43% y 53% respectivamente); No se observó inhibición en los minutos 60 y 120 post-infección con *S. filiformes* (Figura 17).

Con respecto a los polifenoles, el porcentaje de inhibición fue de un 41% al ser tratadas con 5 µg/ml de los PF de *Eisenia arborea* a la hora 0 de la infección por MeV. Los PF de *Solieria filiformis* inhibieron la formación de sincicios en un 63%, y 57% a 0 y 15 minutos. En los otros tiempos de tratamiento con ambos PF se obtuvo un porcentaje de inhibición menospreciable (Figura 18)





**Figura 17.** Inhibición de sincicios por los PS de *Eisenia arborea* y *Solieria filiformis* en los primeros pasos de la infección por MeV. La columnas muestran el porcentaje relativo de sincicios en células Vero infectadas con MeV no tratadas y tratadas con los PS al tiempo -60, 0 de la infección y 15, 30, 60 y 120 post infección.

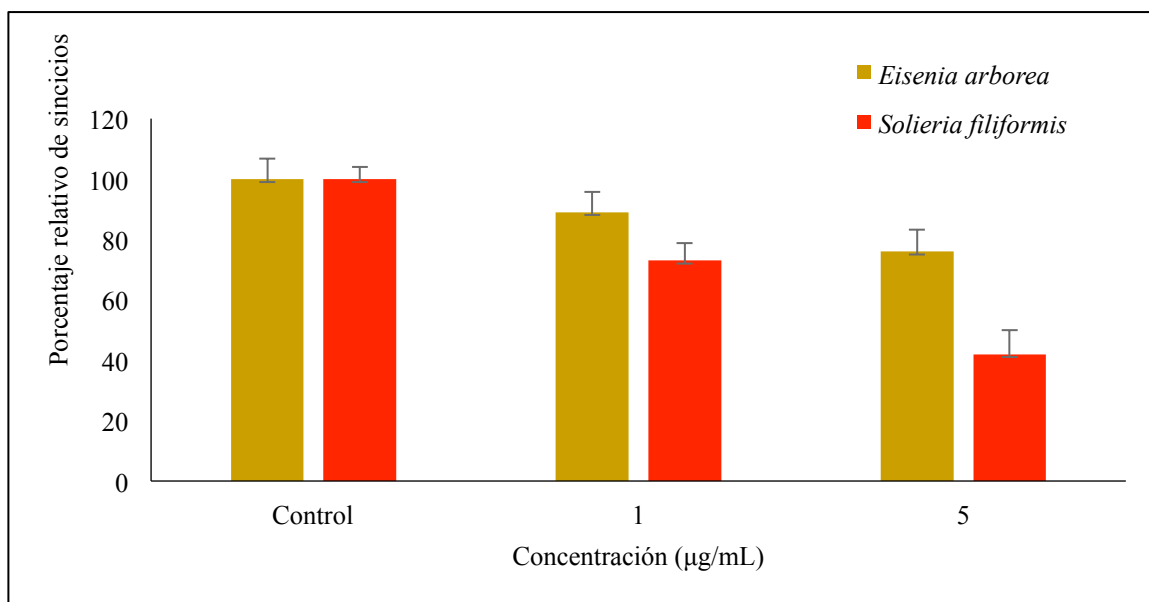


**Figura 18.** Inhibición de sincicios por los Polifenoles de *Eisenia arborea* y *Solieria filiformis* en los primeros pasos de la infección por MeV. Las columnas muestran el porcentaje relativo de sincicios en células Vero infectadas con MeV no tratadas y tratadas con los PF al tiempo -60, 0 de la infección y 15, 30, 60 y 120 post infección.

### **7.3.2 Efecto de los PS y PF de *Eisenia arborea* y *Solieria filiformis* sobre la Penetración Viral en la Célula Hospedera**

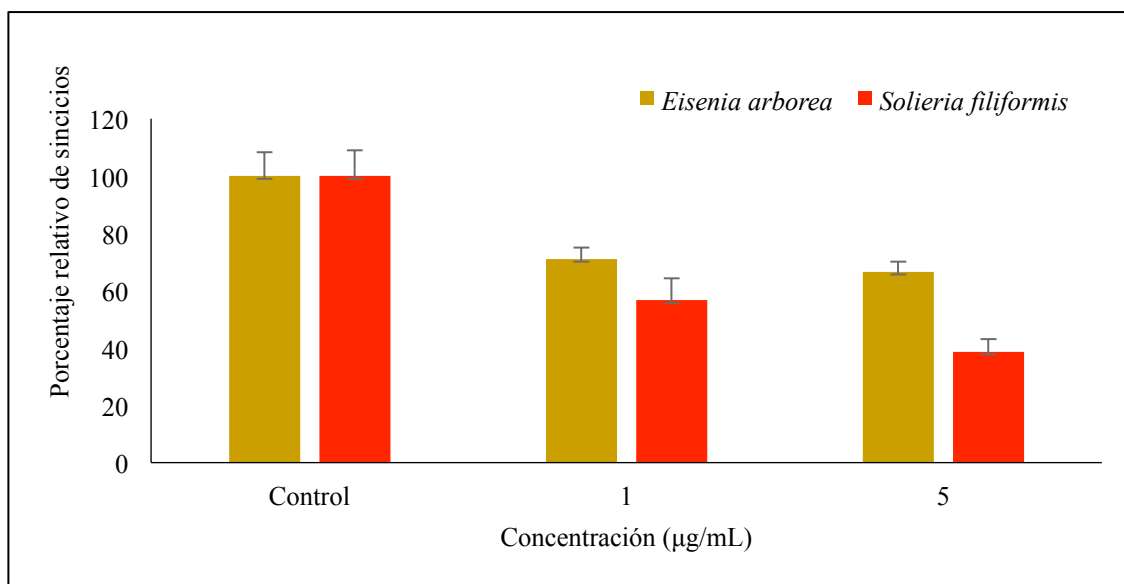
Con el objetivo de determinar si los eventos de entrada posteriores a la unión del virus fueron inhibidos por los PS y PF, las células Vero se incubaron por 3 horas a 4 ° C y posteriormente fueron infectadas con MeV y se incubaron durante 1 h a 4 ° C para permitir la unión del virus, pero evitar la internalización del mismo. Pasado el tiempo de incubación, el virus no adsorbido se eliminó por medio de lavados, se añadieron los compuestos a 1 y 5 µg/mL y se subió a temperatura a 37°C.

Se observó que en el ensayo de penetración viral el efecto inhibitorio de los PS de *Eisenia arborea* era menor al compararlo con los tiempo 0 y 15 del ensayo de tiempos de adición, observando una inhibición del 24% a 5µg/mL para el ensayo de penetración y una inhibición del 55 % a 5µg/mL en el tiempo 0 del ensayo de tiempos de adición (Figura 19 y 17). Estos resultados indican que los PS de *Eisenia arborea* no tienen un efecto tan significativo al inhibir la entrada del virus a la célula, si no que actúan en los primeros minutos de la infección, inhibiendo principalmente la adsorción viral. Sin embargo, al tratar las células con los PS de *Solieria filiformis* en el ensayo de penetración viral, observamos una inhibición del 58% a 5 µg/mL (Figura 19 y 17), y al comparar este dato con el tiempo 0 y 15 del ensayo de tiempos de adición (43% y 53% de inhibición a 5 µg/mL), advertimos que factiblemente una gran parte de la actividad inhibitoria de los PS de *Solieria filiformis* se da por el bloqueo de la entrada del virus a la célula.



**Figura 19.** Efecto de los PS de *Eisenia arborea* y *Solieria filiformis* en la penetración viral. Las columnas muestran el porcentaje relativo de sincicios de células Vero tratadas con los PS después de la infección con MeV a 4 °C y a diferentes concentraciones (1 y 5 µg/mL), con respecto a las células Vero sin tratamiento (control).

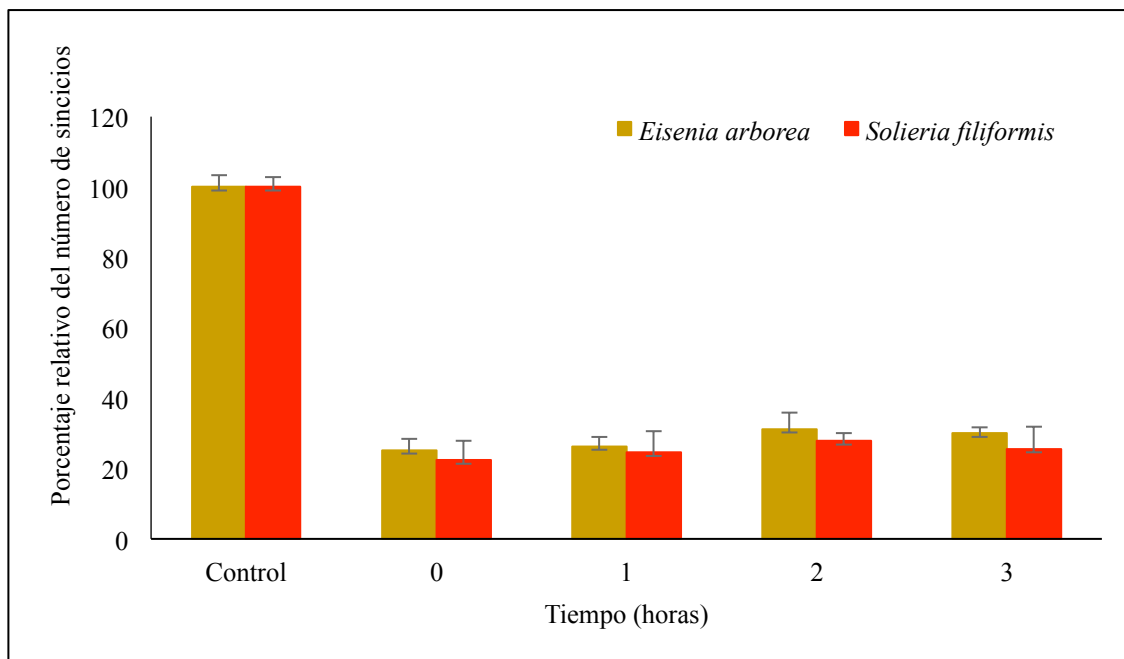
En el ensayo de penetración viral utilizando los PF de *Eisenia arborea* se observó un efecto inhibitorio del 33% a 5 µg/mL, comparado con un 41.2% a 5 µg/mL en el tiempo 0 del ensayo de tiempos de adición (Figura 18 y 20). Al tratar las células con los PF de *Solieria filiformis* en este ensayo, observamos una inhibición del 61% a 5 µg/mL, comparado con 62.8% a 5 µg/mL en el tiempo 0 del ensayo de tiempos de adición (Figura 18 y 20). Estos resultados indican que los PF de *Eisenia arborea* y *Solieria filiformis* inhiben la entrada del virus a la célula, sin embargo, como en el caso de los PS de *Eisenia arborea* al no alcanzar el porcentaje inhibitorio observado en los ensayos de actividad antiviral, es probable que estén actuando a otros niveles del ciclo replicativo o bien, que inactiven directamente a la partícula viral.



**Figura 20.** Efecto de los Polifenoles de *Eisenia arborea* y *Solieria filiformis* en la penetración viral. Las columnas muestran el porcentaje relativo de sincicios de células Vero tratadas con los PF después de la infección con MeV a 4 °C y a diferentes concentraciones (1 y 5 µg/mL), con respecto a las células Vero sin tratamiento (control).

### 7.3.3 Evaluación del efecto virucida de los compuestos seleccionados

Para evaluar el efecto virucida (inhibición de la partícula viral por el compuesto), el virus se puso en contacto con los PS o PF (5 µg/mL) a diferentes tiempos (1, 2 y 3 h) antes de agregarlos a las células Vero. Posteriormente la mezcla de virus y polisacárido se agregó a las células por una hora (adsorción), se retiraron pasado este tiempo y se incubaron por 72h a 37°C. Pasado el tiempo de incubación se obtuvo el porcentaje relativo de sincicios con respecto al control. No se observó diferencia significativa de la actividad inhibitoria de los PS en los diferentes tiempos de interacción del virus con los tratamientos (Figura 21), por lo que se determinó que los PS de *Eisenia arborea* y *Solieria filiformis* no poseen actividad virucida.



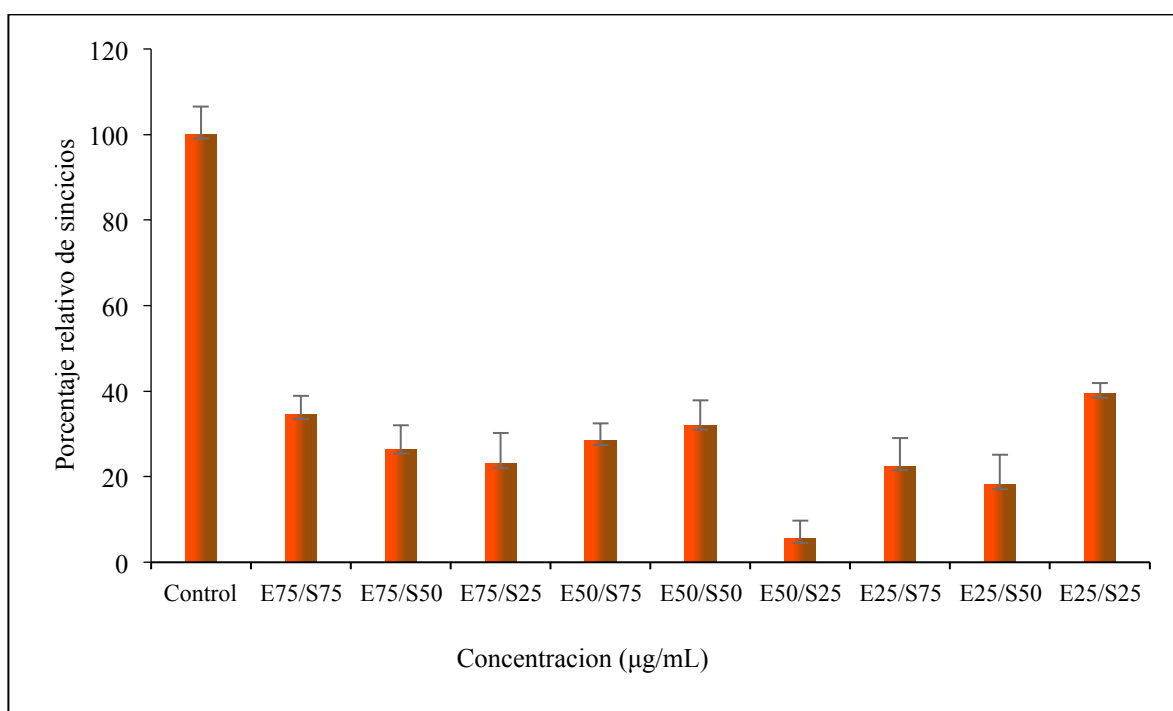
**Figura 21.** Efecto virucida de los PS de *Eisenia arborea* y *Solieria filiformis*. Las columnas muestran el porcentaje relativo de sincicios en células Vero infectadas con MeV expuesto previamente con los PS a diferentes tiempos; con respecto a las células Vero infectadas sin tratamiento (control).

El efecto virucida de los polifenoles seleccionados fue evaluado por el Q.B.P Miguel Pérez; el virus se puso en contacto con el PF por 2, 4 o 6 horas previas a la hora de adsorción; se observó una inhibición total de la actividad antiviral con la mezcla del virus y PF de *Solieria filiformis* con 6 horas de contacto previas a la adsorción y una inhibición del 97% del PF de *Eisenia arborea* con el mismo tratamiento; nuestros resultados nos demuestran que los PF extraídos de ambas algas tienen una potente actividad virucida.

## 7.4 Evaluación del efecto combinado de los compuestos seleccionados

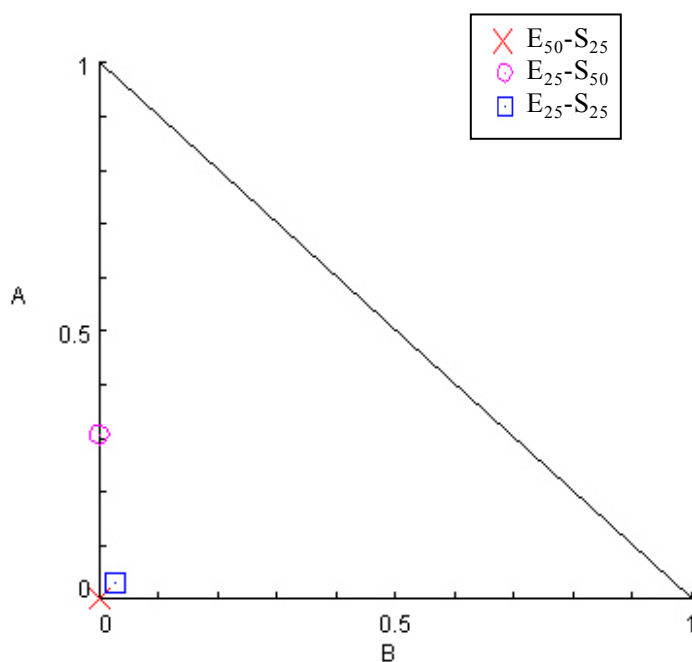
### 7.4.1 Efecto combinado de PS de *Eisenia arborea* y *Solieria filiformis*

Se observó el efecto antiviral de las combinaciones de los PS seleccionados sobre la infección de MeV por medio de ensayos de inhibición de sincicios, probándose combinaciones basadas en sus correspondientes concentraciones inhibitorias  $CI_{75}$ ,  $CI_{50}$  y  $CI_{25}$ :  $E_{25}$ ,  $E_{50}$  y  $E_{75}$  corresponde a los respectivos valores de CI de los PS de *Eisenia arborea*.  $S_{25}$ ,  $S_{50}$  y  $S_{75}$  corresponde a los respectivos valores de CI calculados de los PS de *Solieria filiformis* (Figura 22). Se observó que la combinación  $E_{50}/S_{25}$  fue la más efectiva, con un porcentaje de sincicios de 5% con respecto al control.



**Figura 22.** Efecto antiviral de las combinaciones de los PS. Cada PS fue probado con su correspondiente valor  $CI_{25}$ ,  $CI_{50}$  y  $CI_{75}$ .  $E_{25}$ ,  $E_{50}$  y  $E_{75}$  corresponde al valor  $CI_{25}$ ,  $CI_{50}$  y  $CI_{75}$  de los PS de *Eisenia arborea*.  $S_{25}$ ,  $S_{50}$  y  $S_{75}$  corresponde a los respectivos valores de los PS de *Solieria filiformis*.

El efecto sinérgico de los PS se determinó mediante el cálculo del índice de combinación (IC) descrito previamente por Chou (Chou 2010), y utilizando el software CompuSyn. El método de Chou-Talalay para la combinación de fármacos se basa en la ecuación del efecto de la mediana; derivado del principio de la ley de acción de masas. Esta ecuación general abarca las ecuaciones de Michaelis-Menten, Hills, Henderson-Hasselbalch, y Scatchard de la bioquímica y la biofísica. Se probaron en total 9 combinaciones de las cuales 3 mostraron tener efectos sinérgicos. Para identificar las combinaciones sinérgicas, el isoblograma normalizado generado por el software indica que aquellas que se encuentran por debajo de la recta poseen un efecto sinérgico (Figura 23), siendo las combinaciones  $E_{50}$ - $S_{25}$ ,  $E_{25}$ - $S_{50}$ ,  $E_{25}$ - $S_{25}$  las que mostraron tener efecto sinérgico. La tabla 8 describe los efectos de todas las combinaciones probadas con su correspondiente concentración, siendo las combinaciones con concentraciones más bajas las que mostraron tener un mejor efecto.



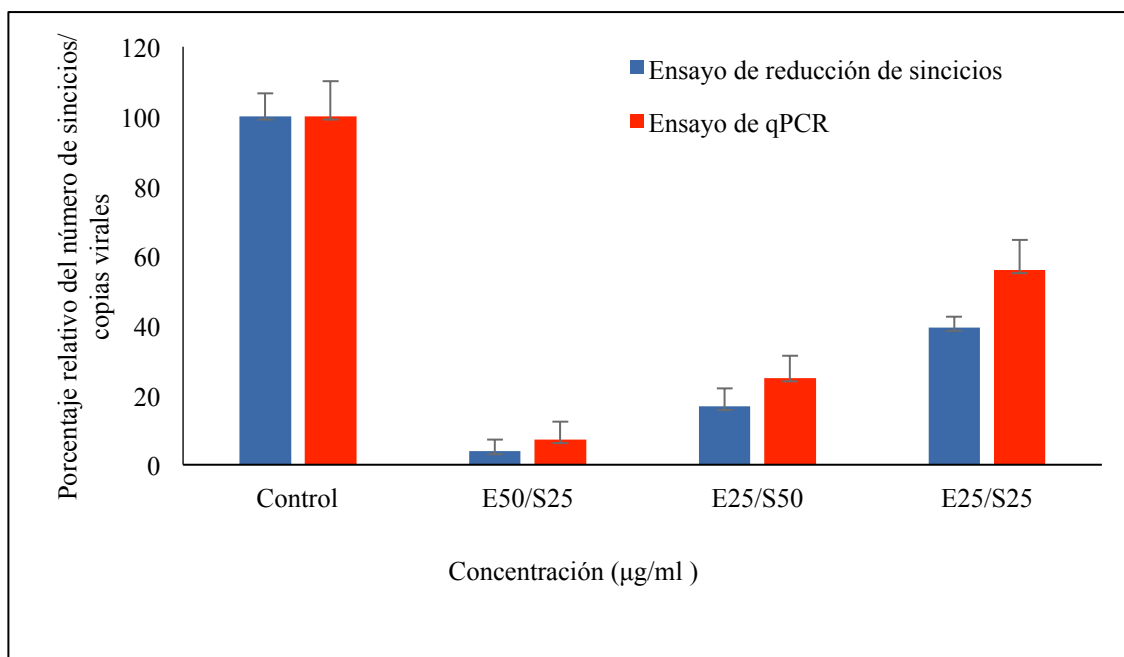
**Figura 23.** Efecto sinérgico de las combinaciones de los PS. Isoblograma normalizado de las combinaciones de los PS de *Eisenia arborea* y *Solieria filiformis* a radios no constantes. Los valores CI representados como puntos debajo de la recta indican sinérgismo.  $E_{25}$ ,  $E_{50}$  y  $E_{75}$  corresponde al valor  $CI_{50}$  y  $CI_{75}$  de los PS de *Eisenia arborea*.  $S_{25}$ ,  $S_{50}$  y  $S_{75}$  corresponde a los respectivos valores de los PS de *Solieria filiformis*.

**Tabla 8.** Efecto antiviral de las combinaciones de los polisacáridos sulfatados

Combinación	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )		% Relativo de número de sincicios	SD	IC	Descripción
	<i>Eisenia arborea</i>	<i>Solieria filiformis</i>				
E <sub>75</sub> -S <sub>75</sub>	2.98	3.027	34.5	4.4	10.59	Antagonismo
E <sub>75</sub> -S <sub>50</sub>	2.98	0.985	26.4	5.6	3.08	Antagonismo
E <sub>75</sub> -S <sub>25</sub>	2.98	0.011	33	7.3	1.47	Antagonismo
E <sub>50</sub> -S <sub>75</sub>	0.275	3.027	28.4	4.1	3.71	Antagonismo
E <sub>50</sub> -S <sub>50</sub>	0.275	0.985	32	5.9	1.88	Antagonismo
<b>E<sub>50</sub>-S<sub>25</sub></b>	<b>0.275</b>	<b>0.011</b>	<b>4</b>	<b>3.2</b>	<b>0.001</b>	<b>Sinergismo</b>
E <sub>25</sub> -S <sub>75</sub>	0.01	3.027	22.5	6.6	1.85	Antagonismo
E <sub>25</sub> -S <sub>50</sub>	0.01	0.985	16.7	7.1	0.31	<b>Sinergismo</b>
E <sub>25</sub> -S <sub>25</sub>	0.01	0.011	39.4	2.5	0.05	<b>Sinergismo</b>

El efecto antiviral de las combinaciones que mostraron efecto sinérgico fue evaluado por medio de la disminución de la carga viral por la técnica de qPCR, confirmándose el efecto antiviral sinérgico de las combinaciones, observándose un porcentaje de número de copias virales de 7.2%, 24.89% y 56% para las combinaciones de E<sub>50</sub>-S<sub>25</sub>, E<sub>25</sub>-S<sub>50</sub>, E<sub>25</sub>-S<sub>25</sub>, respectivamente (Figura 24). Al comparar el efecto inhibitorio determinado por los dos ensayos observamos diferencias no significativas entre estos.

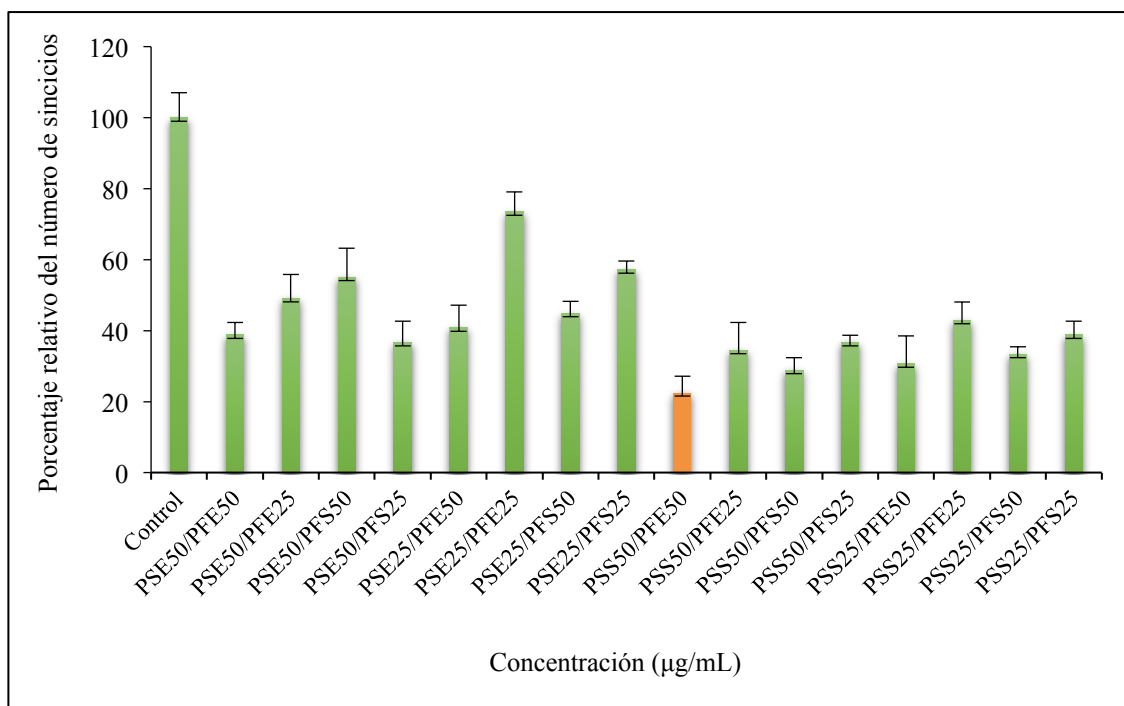




**Figura 24.** Confirmación de la actividad antiviral de las combinaciones sinérgicas de los PS por qPCR. E<sub>25</sub> y E<sub>50</sub> corresponden a los valores de CI<sub>25</sub> y CI<sub>50</sub> de los PS de *Eisenia arborea*. S<sub>25</sub> y S<sub>50</sub> corresponden a los respectivos valores de CI de los PS de *Solieria filiformis*.

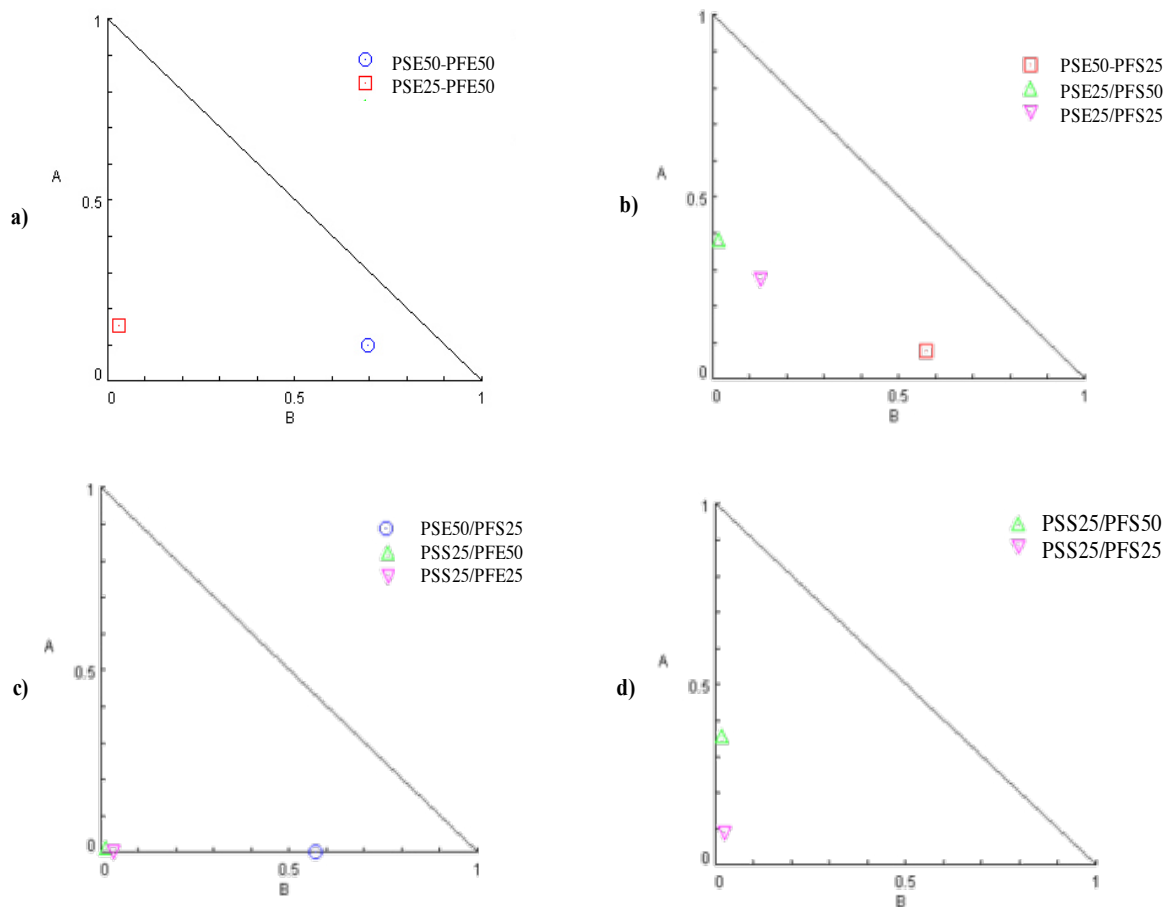
#### 7.4.2 Efecto combinado de los PS y PF de *Eisenia arborea* y *Solieria filiformis*

Se observó el efecto antiviral de las combinaciones de los PS y PF de algas seleccionadas sobre la infección de MeV por medio de ensayos de inhibición de sincicios, probándose combinaciones basadas en su correspondiente valor CI<sub>25</sub> y CI<sub>50</sub>. PSS<sub>25</sub>, PSS<sub>50</sub>, PFS<sub>25</sub> y PFS<sub>50</sub> corresponden a los respectivos valores de CI calculados de los PS y PF de *Solieria filiformis*, respectivamente. PSE<sub>25</sub>, PSE<sub>50</sub>, PFE<sub>25</sub> y PFE<sub>50</sub> corresponden a los respectivos valores de CI de los PS y PF de *Eisenia arborea*. Se observó que la combinación PSS<sub>50</sub>/PFE<sub>50</sub> fue la más efectiva, mostrando un efecto inhibitorio de 77.5% (Figura 25).



**Figura 25.** Efecto antiviral de las combinaciones de los PS y PF de *Eisenia arborea* y *Solieria filiformis* en la infección por MeV. Cada PS y PF fue probado con su correspondiente valor  $CI_{25}$  y  $CI_{50}$ . PSS<sub>25</sub>, PSS<sub>50</sub>, PFS<sub>25</sub> y PFS<sub>50</sub> corresponden a los respectivos valores de CI calculados de los PS y PF de *Solieria filiformis*, respectivamente. PSE<sub>25</sub>, PSE<sub>50</sub>, PFE<sub>25</sub> y PFE<sub>50</sub> corresponden a los respectivos valores de CI de los PS y PF de *Eisenia arborea*.

Se probaron en total 16 combinaciones de las cuales 8 mostraron tener efectos sinérgicos, el isoblograma normalizado generado por el software indica que aquellas que se encuentran por debajo de la recta poseen un efecto sinérgico (Figura 26), siendo la combinación PSS<sub>25</sub>-PFE<sub>50</sub>, la que mostró tener el mejor efecto sinérgico y la mayor actividad antiviral. La tabla 9 describe los efectos de todas las combinaciones probadas con su correspondiente concentración, siendo las combinaciones en las que se encontraba presente el PS de *Solieria filiformis* a bajas concentraciones las que mostraron un mejor efecto sinérgico.

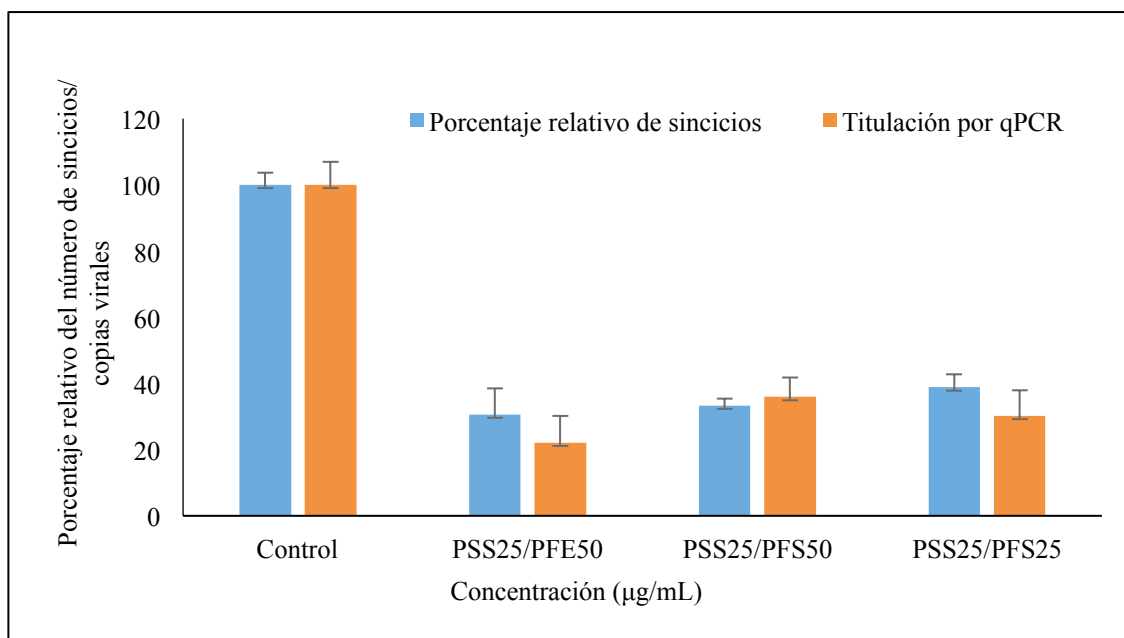


**Figura 26.** Efecto sinérgico de las combinaciones de los PS y polifenoles. a) Isobolograma normalizado de las combinaciones de los polifenoles de *Eisenia arborea* y los polisacáridos sulfatados de *Eisenia arborea* a radios no constantes. b) Isobolograma normalizado de las combinaciones de los polifenoles de *Solieria filiformis* y los polisacáridos sulfatados de *Eisenia arborea* a radios no constantes. c) Isobolograma normalizado de las combinaciones de los polifenoles de *Eisenia arborea* y los polisacáridos sulfatados de *Solieria filiformis* a radios no constantes. d) Isobolograma normalizado de las combinaciones de los polifenoles de *Solieria filiformis* y los polisacáridos sulfatados de *Solieria filiformis* a radios no constantes.

**Tabla 9.** Efecto antiviral de las combinaciones de los PS y PF

Combinación	Concentración (µg/mL)				% Relativo de número de sincicios	SD	IC	Descripción
	Polisacáridos		Polifenoles					
	<i>Eisenia arborea</i>	<i>Solieria filiformis</i>	<i>Eisenia arborea</i>	<i>Solieria filiformis</i>				
PSE <sub>50</sub> -PFE <sub>50</sub>	0.275	-	2.6	-	38.8	3.5	0.79	<b>Sinergismo</b>
PSE <sub>50</sub> -PFE <sub>25</sub>	0,275	-	0.03	-	49.1	6.8	1.75	Antagonismo
PSE <sub>50</sub> -PFS <sub>50</sub>	0.275	-	-	0.4	55.1	8.1	4.4	Antagonismo
PSE <sub>50</sub> -PFS <sub>25</sub>	0.275	-	-	0.07	36.7	5.9	0.65	<b>Sinergismo</b>
PSE <sub>25</sub> /PFE <sub>50</sub>	0.01	-	2.6	-	40.8	6.4	0.19	<b>Sinergismo</b>
PSE <sub>25</sub> /PFE <sub>25</sub>	0.01	-	0.03	-	73.5	5.6	3.6	Antagonismo
PSE <sub>25</sub> /PFS <sub>50</sub>	0.01	-	-	0.4	44.9	3.3	0.4	<b>Sinergismo</b>
PSE <sub>25</sub> /PFS <sub>25</sub>	0.01	-	-	0.07	57.14	2.5	0.4	<b>Sinergismo</b>
PSS <sub>50</sub> /PFE <sub>50</sub>	-	0.985	2.6	-	22.5	4.6	0.57	<b>Sinergismo</b>
PSS <sub>50</sub> /PFE <sub>25</sub>	-	0.985	0.03	-	34.5	7.8	1.85	Antagonismo
PSS <sub>50</sub> /PFS <sub>50</sub>	-	0.985	-	0.4	28.8	3.5	1.37	Antagonismo
PSS <sub>50</sub> /PFS <sub>25</sub>	-	0.985	-	0.07	36.7	2	2.25	Antagonismo
<b>PSS<sub>25</sub>/PFE<sub>50</sub></b>	-	<b>0.01</b>	<b>2.6</b>	-	<b>30.6</b>	<b>7.9</b>	<b>0.03</b>	<b>Sinergismo</b>
PSS <sub>25</sub> /PFE <sub>25</sub>	-	0.01	0.03	-	42.9	5.1	0.04	<b>Sinergismo</b>
PSS <sub>25</sub> /PFS <sub>50</sub>	-	0.01	-	0.4	33.3	2.2	0.38	<b>Sinergismo</b>
PSS <sub>25</sub> /PFS <sub>25</sub>	-	0.01	-	0.07	38.8	3.9	0.11	<b>Sinergismo</b>

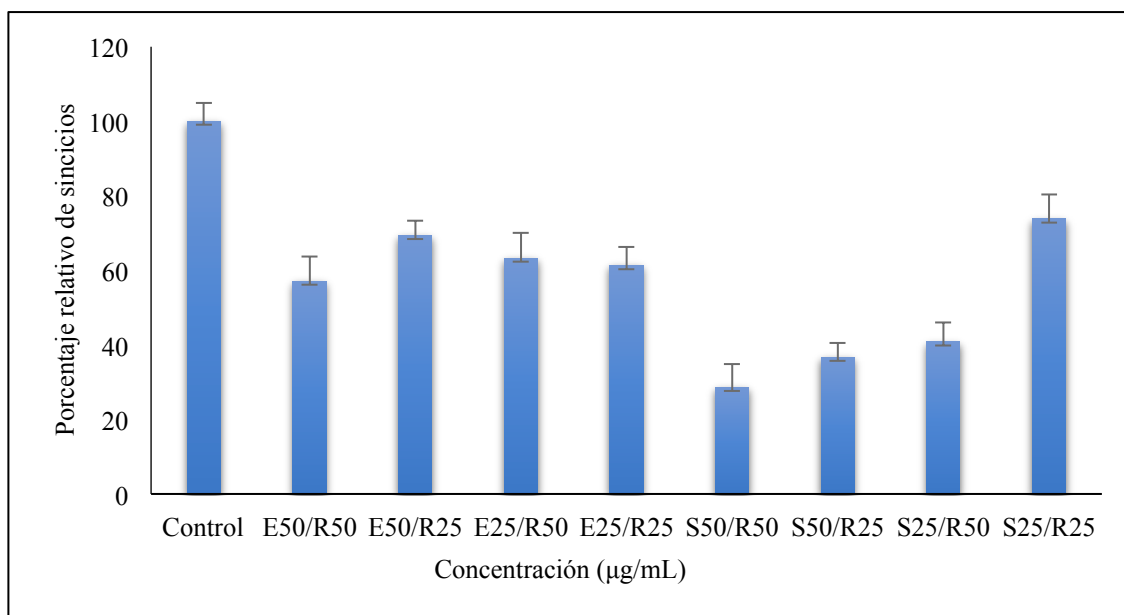
El efecto antiviral de la combinaciones que mostraron efecto sinérgico fue confirmado por medio de la disminución de la carga viral por la técnica de qPCR, reafirmandose el efecto antiviral sinérgico de las combinaciones, observándose porcentajes de número de copias virales de 22.1%, 35.9% y 30.2% para las combinaciones de PSS<sub>25</sub>-PFE<sub>50</sub>, PSS<sub>25</sub>-PFS<sub>50</sub>, PSS<sub>25</sub>-PFS<sub>25</sub>, respectivamente (Figura 27). Al comparar el efecto inhibitorio determinado por los dos ensayos observamos diferencias no significativas entre estos.



**Figura 27.** Confirmación de la actividad antiviral de las combinaciones sinérgicas de PS y PF por qPCR. PSS<sub>25</sub> corresponde al valor de CI<sub>25</sub> de los PS de *Solieria filiformis*. PFE<sub>50</sub>, PFS<sub>50</sub> y PFS<sub>25</sub> corresponden a los valores de CI<sub>50</sub> y CI<sub>25</sub> de los polifenoles de *Eisenia arborea* y *Solieria filiformis*, respectivamente.

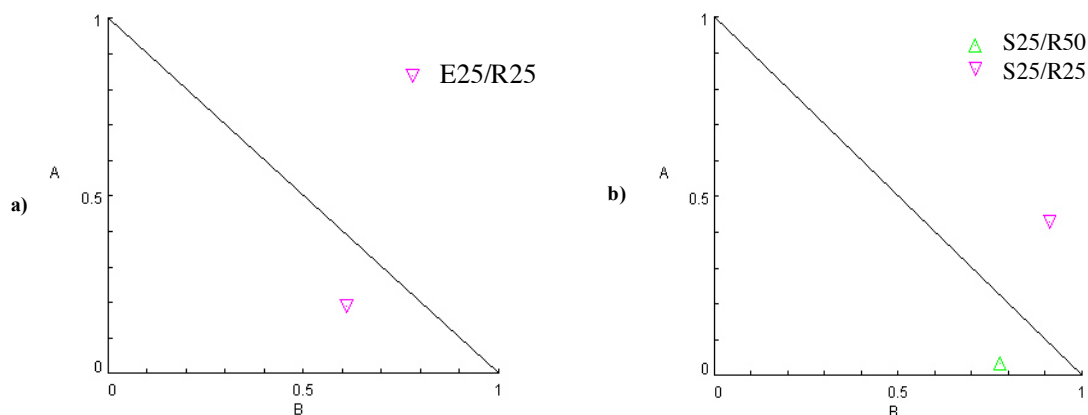
#### 7.4.3 Efecto de los PS de *Eisenia arborea* y *Solieria filiformis* en combinación con la ribavirina

Se observó el efecto antiviral de las combinaciones de los PS y la ribavirina sobre la infección de MeV por medio de ensayos de inhibición de sincicios, probándose combinaciones basadas en sus valores CI<sub>25</sub> y CI<sub>50</sub>. S<sub>25</sub>, S<sub>50</sub>, E<sub>25</sub> y E<sub>50</sub> corresponden a los respectivos valores de CI calculados de los PS de *Solieria filiformis* y *Eisenia arborea*, respectivamente. R<sub>25</sub> y R<sub>50</sub> (16 y 35 µg/mL), corresponden a los respectivos valores de CI calculados para la ribavirina por el QBP Edgar Amaro en su trabajo de tesis de licenciatura. Se observó que la combinación S<sub>50</sub>/R<sub>50</sub> fue la más efectiva, mostrando un efecto inhibitorio de 71.4% (Figura 28).



**Figura 28.** Efecto antiviral de las combinaciones de los PS de *Eisenia arborea* y *Solieria filiformis* y la ribavirina en la infección por MeV. Cada PS fue probado con su correspondiente valor  $CI_{25}$  y  $CI_{50}$ .  $E_{25}$  y  $E_{50}$  corresponden a los respectivos valores de CI calculados de los PS de *Eisenia arborea*.  $S_{25}$  y  $S_{50}$  corresponden a los respectivos valores de CI calculados de los PS de *Solieria filiformis*.  $R_{25}$  y  $R_{50}$  corresponde a los respectivos valores de CI calculados de la ribavirina.

El efecto sinérgico de los PS y la ribavirina se determinó mediante el cálculo del índice de combinación (IC) usando el software CompuSyn como ya se ha descrito anteriormente. Se probaron en total 8 combinaciones de las cuales 2 mostraron tener efectos sinérgicos. Para identificar las combinaciones sinérgicas, el isoblograma normalizado generado por el software indica que aquellas que se encuentran por debajo de la recta poseen un efecto sinérgico (Figura 29), siendo las combinación  $S_{25}$ - $R_{50}$  y  $E_{25}$ - $R_{25}$  las que mostraron tener el mejor efecto sinérgico pero no fueron las que obtuvieron la mayor actividad antiviral. La tabla 10 describe los efectos de todas las combinaciones probadas con su correspondiente concentración.

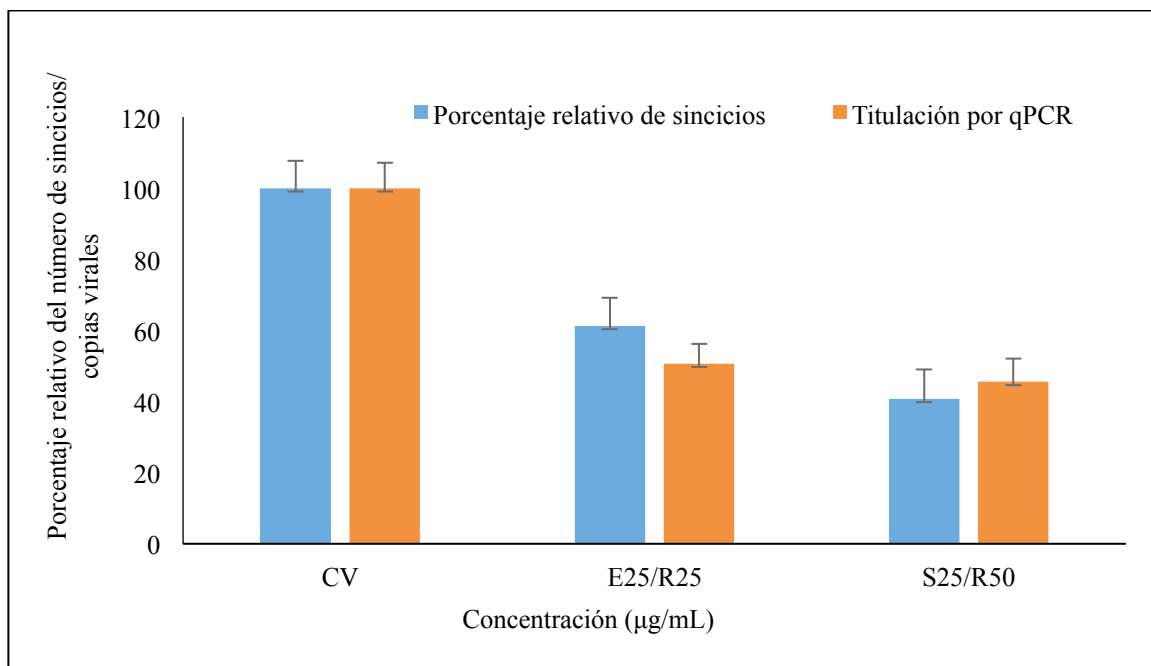


**Figura 29.** Efecto sinérgico de las combinaciones de los PS y la ribavirina. a) Isoblograma normalizado de las combinaciones de los polisacáridos sulfatados de *Eisenia arborea* y la ribavirina a radios no constantes. b) Isoblograma normalizado de las combinaciones de los polisacáridos sulfatados de *Solieria filiformis* y la ribavirina a radios no constantes.

**Tabla 10.** Efecto antiviral de las combinaciones de los PS y la ribavirina

Combinación	Concentración (µg/mL)			% Relativo de número de sincicios	SD	IC	Descripción
	Polisacáridos		Ribavirina				
	<i>Eisenia arborea</i>	<i>Solieria filiformis</i>					
E50/R50	0.275	-	35	57.14	6.6	4.8	Antagonismo
E50/R25	0,275	-	16	69.4	3.9	13.6	Antagonismo
E25/R50	0.01	-	35	63.3	6.7	1.65	Antagonismo
E25/R25	0.01	-	16	61.3	4.9	0.8	<b>Sinergismo</b>
S50/R50	-	0.985	35	28.6	6.2	1.6	Antagonismo
S50/R25	-	0.985	16	36.7	3.9	2.5	Antagonismo
S25/R50	-	0.011	35	40.8	5.2	0.8	<b>Sinergismo</b>
S25/R25	-	0.011	16	73.8	6.6	1.34	Antagonismo

El efecto antiviral de la combinaciones que mostraron el mejor efecto sinérgico fue confirmado por medio de la técnica de qPCR, confirmándose dicho efecto, observándose un porcentaje de número de copias de 50.71% y 45.6% para las combinaciones de E<sub>25</sub>-R<sub>25</sub> y S<sub>25</sub>-R<sub>50</sub> (Figura 30). Al comparar el efecto inhibitorio determinado por los dos ensayos observamos diferencias no significativas entre estos.



**Figura 30.** Confirmación de la actividad antiviral de las combinaciones sinérgicas de PS con la ribavirina por qPCR. E<sub>25</sub> y S<sub>50</sub> corresponden a los valores de CI<sub>25</sub> y CI<sub>50</sub> de los PS de *Eisenia arborea* y *Solieria filiformis*, respectivamente. R<sub>25</sub> y R<sub>50</sub> corresponden a los valores de CI<sub>25</sub> y CI<sub>50</sub> de la ribavirina.



## DISCUSIÓN

El virus del sarampión (MeV) pertenece a la familia Paramyxoviridae del orden de los Mononegavirales, es un virus de RNA de cadena negativa no segmentado y causa una enfermedad altamente contagiosa (Moss y Griffin 2012). Actualmente no existe un antiviral eficaz y con baja citotoxicidad que se utilice como tratamiento contra esta enfermedad, aunque se puede prevenir mediante la vacunación, el sarampión sigue siendo el causante de muertes infantiles en todo el mundo (Moss y Griffin 2006). Muchos nuevos medicamentos antivirales han sido autorizados en los últimos años, la mayoría de los cuales se utilizan para el tratamiento de las infecciones por el HIV (Antonelli y Turriziani 2012). La investigación de antivirales naturales aislados de fuentes marinas es un enfoque interesante en el desarrollo de nuevos agentes antivirales. En el presente estudio, probamos la actividad antiviral de PS aislados de cinco algas mexicanas contra MeV.

Desde los primeros estudios realizados por Gerber en 1958 que muestran la inhibición del virus de la influenza B por polisacáridos de algas marinas; se han realizado múltiples investigaciones en este campo (Gerber et al. 1958). Estudios previos han demostrado la no citotoxicidad de PS aislados de ciertas especies de algas marinas (Dinesh et al. 2015). En el presente estudio se probó la actividad antiviral de 5 extractos de algas mexicanas, tomando en cuenta su citotoxicidad para obtener su Índice de Selectividad. Ninguno de los compuestos probados provocó una citotoxicidad significativa a las concentraciones terapéuticas propuestas (Figura 12). La ausencia de citotoxicidad en las células huésped es uno de los principales retos en el desarrollo de nuevos antivirales.

*Eisenia arborea*, una alga marrón comestible usada en la medicina popular en Japón, es la especie de algas marinas con la distribución latitudinal más grande y más meridional en la Costa Este del Pacífico Norte (Sugiura et al. 2008, Zertuche-González et al. 2013). Los estudios sobre las actividades biológicas de *Eisenia* se han centrado en la evaluación de sus compuestos polifenólicos (Li et al. 2014). Hasta donde sabemos, los

efectos antivirales de los extractos de *Eisenia arborea* nunca han sido probados antes. En este estudio se observó que el extracto de *Eisenia arborea* es rico en fucoidanes y alginatos, además mostró tener el mejor efecto inhibitorio (Figura 13) y el mejor IS de los cinco extractos de algas marinas probados (Tabla 6). La caracterización química posterior de los extractos de *E. arborea* también reportó la presencia de alginatos, con mayor contenido de sulfatos totales (Anexo 1) que los reportados en estudios previos (Grasdalen et al. 1981, Arvizu et al. 2007). Estudios previos sugieren que tanto el ácido glucurónico como los residuos sulfatados de fucosa afectan críticamente el efecto antiviral del fucoidan (Hidari et al. 2008). Alginatos con efectos antivirales se han probado previamente contra el HIV y HBV, mostrando una potente actividad antiviral (Xianliang et al. 2000, Ahmadi et al. 2015). La actividad antiviral de fucoidan también se ha probado *in vitro* e *in vivo* contra muchos virus de RNA y DNA como el HIV, HSV1-2, el virus del dengue, NDV y CDV (Hayashi et al. 2008, 2013, Hidari et al. 2008, Elizondo-Gonzalez et al. 2012, Trejo-Avila et al. 2014, Aguilar-Briseño et al. 2015, Dinesh et al. 2015).

*Macrocystis pyrifera* se ha cosechado desde 1956 a lo largo de la costa pacífica de Baja California y se exporta a los Estados Unidos para la producción de alginatos (Valdez et al. 2003). Los extractos de PS de *Macrocystis pyrifera* de México mostraron un efecto antiviral significativo pero no se seleccionaron para ensayos posteriores debido a que a pesar de no alcanzar una  $CC_{50}$  a las concentraciones evaluadas, fueron ligeramente citotóxicos a 1500  $\mu\text{g/mL}$ , además de resultar con un IS bajo con respecto a los demás (Tabla 6). Estudios previos con extractos de dializados crudos de *Macrocystis pyrifera* han demostrado efectos antivirales contra el VSV, siendo el fucoidan el responsable de estos resultados (Mayer et al. 1987).

Las especies de *Ulva* son cosmopolitas y en aguas ricas en nutrientes son a menudo las especies dominantes causando mareas verdes (Leskinen et al. 2004). La actividad antiviral del género *Ulva* ha sido previamente estudiada principalmente contra virus de importancia aviar (Aguilar-Briseño et al. 2015, Marques et al. 2015). Los PS extraídos de *Ulva intestinalis* aunque mostraron efecto antisarampión (Figura 14) no

fueron seleccionados para experimentos subsecuentes por las mismas razones previamente descritas para *M. pyrifer*.

*Pelvetia compressa* ha sido utilizada como modelo para el análisis del citoesqueleto en el estudio de las algas (Hable et Hart, 2010), no se ha observado previamente la actividad antiviral de esta especie, pero estudios anteriores describen la actividad antiviral de PS de *Pelvetia fastigiata* contra HBV (Venkateswaran et al, 1989). A pesar de la capacidad de inhibir al MeV de los PS extraídos de esta alga (Tabla 6), no fue seleccionada por las mismas razones expuestas para los dos PS previamente mencionados. Los PS de *Ulva intestinalis* y *Pelvetia compressa* mostraron una actividad antiviral no dependiente de dosis (Figura 14); este fenómeno ya ha sido previamente observado al estudiar distintas actividades biológicas de PS (Aguilar-Briseño et al. 2015, Michalak et al. 2017) estos fenómenos pueden estar relacionados con la permeabilidad de las células y con la agregación de los compuestos analizados (Vilanova et al. 2009).

El extracto de PS de *Solieria filiformis* mostró tener la segunda  $CI_{50}$  más baja entre los extractos analizados. Estudios *in vitro* han informado de las propiedades antivirales de carragenanos frente a virus de DNA y RNA (Buck et al. 2006, Luo et al. 2015). Se demostró que la carragenina comercial (Rong Yuan FFI Co., Ltd.) pudo inhibir al virus de influenza A/Swine/Shandong/731/2009 H1N1 (SW731) responsable de la pandemia de influenza de 2009; la carragenina inhibió significativamente la replicación de SW731 interfiriendo con diferentes etapas de replicación viral, incluyendo adsorción, transcripción y expresión de las proteínas víricas; sin embargo, actuó especialmente inhibiendo las interacciones entre el receptor viral (HA) y la célula diana (Shao et al. 2015). El análisis de contenido de sulfato y la determinación total de polisacáridos de *S. filiformis* resultaron en 21,14% ( $\pm 0,056$ ) de sulfato total y 91% de polisacárido total; estos datos son coherentes con los informes anteriores (Wivianne et al. 2012). El grado de sulfatación tiene un gran impacto en la actividad antiviral de polisacáridos, incluyendo los carragenanos (Wang et al. 2012).

Los PS de *Eisenia* sp y *Solieria filiformis* fueron seleccionados porque mostraron tener los mejores IS entre los extractos probados, con un de IS  $> 5454.54$ ,  $>1522.84$  (Tabla 6), el efecto de los PS seleccionados sobre la carga viral fue evaluado por medio de una titulación viral por qPCR (Figura 15 y 16), concordando con los resultados obtenidos sobre la inhibición de sincicios.

Para conocer el mecanismo de acción de los PS se realizaron experimentos de tiempos de adición, penetración viral y ensayos virucidas; estos experimentos no solo se realizaron con los PS de interés si no también con los Polifenoles (PF) seleccionados en experimentos previos realizados por el Q.B.P Miguel Pérez (en su proyecto de tesis de licenciatura). Los PF seleccionados fueron del mismo modo los correspondientes a las algas *Eisenia* sp y *Solieria filiformis*; con IS  $<577$  y  $>3750.84$ , respectivamente (Tabla 7).

Los ensayos sugieren que los PS de *Eisenia* sp actúan en las primeras etapas de la infección, con mayor influencia en la adsorción viral, como se observa en los experimentos de tiempos de adición, donde se advierte una mayor inhibición de MeV a los minutos -60, 0 y 15 de contacto con los PS (Figura 17). Probablemente el efecto de estos PS puede incidir también, aunque en menor proporción, sobre la entrada del virus a la célula huésped como observamos en la Figura 19. El efecto de los PS de *Eisenia* sp no fue directamente sobre la partícula viral (actividad virucida), ya que no se observó diferencia significativa del efecto de los PS a diferentes tiempos de contacto con el MeV (0, 1, 2 y 3 H) previos a la infección viral (Figura 21). Nuestros resultados coinciden con estudios recientes, donde se observa que los fucoidanes y alginatos exhiben su actividad antiviral cuando el compuesto está presente durante el período de adsorción del virus al bloquear la interacción de los virus con las células (Besednova et al. 2016).

Los PS de *Solieria filiformis*, actúan del mismo modo en las primeras etapas de la infección, con mayor influencia en la penetración viral. Los ensayos de tiempos de adición muestran un mayor efecto de los PS agregándolos a los minutos 0 y 15 de la infección, y no al agregar el compuesto 1 hora antes de la infección por MeV (Figura 17), los ensayos de penetración viral demostraron un porcentaje de inhibición indicadora

de este efecto (Figura 19), ambos ensayos sugieren que los PS de *Solieria filiformis* actúan principalmente inhibiendo la entrada del virus a la célula.

Nuestros resultados están de acuerdo con los observados por Elizondo-Gonzalez et al. que demostraron la capacidad antiviral del fucoidan de *C. okamuranus* contra el virus de la enfermedad de Newcastle, sugiriendo que el fucoidan inhibe la penetración viral en las células huésped, probablemente al bloquear la proteína F (Elizondo-Gonzalez et al. 2012). Resultados similares también fueron observados por Bouhlal et al., quienes sugirieron que los carragenanos pueden inhibir la replicación del DENV interfiriendo en la entrada viral, pero también sugirieron que los SP podrían evitar la adsorción viral en la célula como un segundo modo de acción (Bouhlal et al. 2011).

Del mismo modo que los PS de *Eisenia arborea*, los PS de *Solieria filiformis* no mostraron actividad virucida (Figura 21).

Los PF de *Eisenia arborea* de *Solieria filiformis* mostraron tener un efecto inhibitorio notable a los minutos 0 y 15 de la infección; se encontró una disminución de sincicios y de carga viral en los ensayos de penetración viral; y el mejor efecto inhibitorio se observó al realizar el ensayo virucida, disminuyendo al 100% la formación de sincicios a las 6 horas de interacción polifenol-virus. Seguramente el efecto de estos compuestos polifenólicos sea directamente inactivando al virión y de esta forma impidiendo que este se adsorva y penetre a la célula hospedera, efecto que vemos consecuentemente en los ensayos de tiempos de adición y penetración.

Nuestros resultados coinciden con los observados por Carlucci et al., quienes han demostrado que los carragenanos de *Gigartina skottsbergii* tienen efecto antiviral contra la etapa de adsorción del virus HSV-1 y HSV-2 a la célula (Carlucci et al. 1997). La actividad virucida de los carragenanos contra virus envueltos, fue del mismo modo observada posteriormente por Carlucci et al. Quienes encontraron que los carragenanos tipo  $\lambda$  pueden unirse firmemente al virus herpes simplex (HSV), lo que

lleva a la inactivación del virión, sus estudios sugieren, además, que la carragenina cambia la estructura de las glicoproteínas gB y gC del HSV (Carlucci et al. 2012).

Dada la actividad presentada a diferentes niveles de los compuestos seleccionados esperábamos un efecto sinérgico o aditivo al mezclarlos.

Hoy en día, la combinación de múltiples fármacos es un enfoque primario para mejorar los efectos antivirales en el campo de la terapia antiviral. Las ventajas de la combinación de múltiples fármacos son la reducción de dosis individuales de fármacos, una disminución de los efectos secundarios de los agentes antivirales y la prevención de la aparición de virus resistentes a fármacos. Las teorías de la combinación de fármacos proporcionan una herramienta ideal para comprender los beneficios de esta terapia (Koizumi y Iwami 2014).

El hecho de que los PS de *Solieria filiformis* tengan un mejor efecto en la entrada del virus y que los PS de *Eisenia arborea* tengan un mejor efecto en la adsorción viral sugieren un potencial sinérgico al mezclarse; por lo que se realizaron ensayos combinando ambos PS con sus correspondientes  $CI_{75}$ ,  $CI_{50}$  y  $CI_{25}$ . Nuestros resultados determinaron que la combinación  $E_{50}/S_{25}$  fue la más efectiva, con un porcentaje de inhibición del 96%. El efecto observado de la mezcla fue mayor al efecto individual de cada PS (50% de Inhibición con 0.275  $\mu\text{g/mL}$  y 0.985  $\mu\text{g/mL}$  de *E. arborea* y *S. filiformis*, respectivamente). El efecto sinérgico de los PS se calculó utilizando el software CompuSyn, el isoblograma normalizado generado por el software (Figura 23) indica que las combinaciones  $E_{50}-S_{25}$ ,  $E_{25}-S_{50}$ ,  $E_{25}-S_{25}$  son las que mostraron tener efecto sinérgico (IC de 0.001, 0.31 y 0.05, respectivamente). La combinación  $E_{50}/S_{25}$  mostró tener el mejor efecto sinérgico (con el IC más bajo, 0.001), además del mejor efecto inhibitorio (96% de inhibición) (Tabla 8).

La actividad virucida de los PF de las algas seleccionadas sugiere un efecto sinérgico o aditivo al mezclarse con los PS seleccionados, por lo que se realizó la combinación de los compuestos con sus correspondientes valores  $CI_{25}$  y  $CI_{50}$ . La

combinación PSS<sub>50</sub>/PFE<sub>50</sub> mostró el mayor efecto inhibitorio (Figura 25), sin embargo, a pesar de mostrar efecto sinérgico no fue la mejor, siendo la combinación PSS<sub>25</sub>/PFE<sub>50</sub> la que mostró tener un mejor efecto sinérgico (Tabla 9).

El efecto de la ribavirina sobre un blanco diferente de acción en el ciclo viral (la replicación de los virus de RNA) nos sugería un efecto sinérgico al mezclarse con los PS seleccionados. Las mezclas de la ribavirina con los PS se realizaron combinando sus correspondientes valores CI<sub>25</sub> y CI<sub>50</sub>. La combinación de S<sub>50</sub>/R<sub>50</sub> mostró tener el mejor efecto inhibitorio (Figura 28), sin embargo al analizarse por medio del software se observó antagonismo. Las mezclas con el mejor efecto sinérgico fueron E<sub>25</sub>/R<sub>25</sub> y S<sub>25</sub>/R<sub>50</sub> (Tabla 10). La ribavirina es un compuesto muy citotóxico (Elizondo-Gonzalez et al. 2012) y su efectividad al 50% la alcanza a concentraciones altas del compuesto por estas razones a pesar de haber alcanzado un efecto sinérgico con los PS algales, encontramos mucho mejor sinergismo con las combinaciones de los compuestos PS y PF a bajas concentraciones de los compuestos.

Las combinaciones con mejor efecto inhibitorio no siempre resultaron ser las que actuaban de manera sinérgica, ya que el efecto combinado de estos compuestos es dependiente de su mecanismo y su concentración. En la mayoría de los casos se observaron efectos antagónicos a altas concentraciones en nuestro estudio; el efecto antagónico de los de PS se observó previamente en una combinación de ulvan y fucoidan contra la infección por NDV (Aguilar-Briseño et al. 2015). Las características químicas particulares de PS, como las ramificaciones de sus cadenas podrían explicar los efectos antagonistas observados. Además, las interacciones entre carbohidratos e hidratos de carbono podrían ser responsables de los eventos de adhesión; estos fenómenos han sido previamente observados en las esponjas marinas (Vilanova et al. 2009).

El efecto sinérgico observado en este estudio resultó principalmente en las combinaciones a bajas concentraciones, esto también ha sido observado previamente para los polisacáridos sulfatados de *Fucus vesiculosus* en combinación con AZT contra

el HIV (Sugawara et al. 1898). Además, este efecto se ha observado también con el aciclovir en combinación con 3, 19-isopropilideno-anfológrafo, contra cepas del virus herpes simplex (wild-type) y resistentes a fármacos. Bajas concentraciones de estos compuestos fueron necesarios para una completa inhibición de la replicación del ADN y la síntesis de proteínas tardías de HSV-1 de tipo salvaje y resistente a fármacos HSV-1 (Priengprom et al. 2015). El efecto combinado de la nitazoxanida con los inhibidores de la neuraminidasa contra los virus de la gripe A probados *in vitro* sugiere que los regímenes que combinan los inhibidores de la neuraminidasa y el nitazoxanuro ejercen efectos sinérgicos contra la gripe (Belardo et al. 2015).

En relación a la terapia combinada utilizada en este estudio, los resultados mostraron un fuerte efecto sinérgico al combinar bajas concentraciones de PS y antagonismo al combinar altas concentraciones. Aunque en algunos casos las concentraciones sinérgicas no resultaron ser las que poseían mayor porcentaje inhibitorio.

El sinergismo presentado a bajas concentraciones, propone un efecto terapéutico deseable a concentraciones inferiores a las utilizadas de manera individual, lo que reduce su toxicidad celular y evita la resistencia del virus a la acción de éstas moléculas.

El uso de metabolitos secundarios de algas como agentes antivirales ha sido probado para una gran cantidad de virus envueltos de importancia médica y veterinaria (RSV, CDV e influenza) (Hayashi et al. 2013, Lin et al. 2014, Trejo-Avila et al. 2014); por lo que los compuestos probados en el presente trabajo pueden ser potentes antivirales no solo para el virus de sarampión sino también para otros virus envueltos de la misma familia o familias relacionadas, de importancia médica y/o veterinaria, probablemente con una dinámica similar; potenciando su efecto al combinarse a bajas concentraciones, actuando a diferentes niveles del ciclo de replicación, con alta selectividad y baja toxicidad, por todo esto, describiendo las características deseadas en una terapia antiviral ideal.



## CONCLUSIONES

Los polisacáridos sulfatados y polifenoles extraídos de algas mexicanas mostraron una baja citotoxicidad in vitro en células Vero, con  $CC_{50} > 1,500 \mu\text{g/mL}$ , y una citotoxicidad despreciable a las concentraciones terapéuticas propuestas.

Los polisacáridos sulfatados y polifenoles de las algas mexicanas fueron potentes inhibidores del virus de sarampión, siendo los compuestos extraídos de *Eisenia* sp y *Solieria filiformis* los más efectivos (con  $IS > 1500$ ), por lo que se seleccionaron estos compuestos para dilucidar su mecanismo de acción y determinar su efecto al combinarse.

La acción antiviral ejercida por los polisacáridos sulfatados de *Eisenia* sp y *Solieria filiformis* ocurre principalmente en las primeras etapas del ciclo de replicación (adsorción y entrada viral); por otro lado los polifenoles extraídos de estas mismas algas tienen una potente actividad virucida contra el virus de sarampión.

El efecto combinado de los polisacáridos sulfatados y polifenoles de algas mexicanas resultó en un efecto sinérgico a bajas concentraciones y un efecto antagonista al combinar altas concentraciones de los compuestos.

Las combinaciones de polisacáridos sulfatados y la ribavirina resultaron en su mayoría antagonicas, observando efectos sinérgicos a bajas concentraciones de los PS.

De todas las combinaciones probadas las combinaciones entre los polisacáridos sulfatados de *Eisenia* sp y *S. filiformes* fueron las que mostraron mayor potencial inhibitorio y sinérgico.

Los polisacáridos sulfatados y polifenoles de algas de litorales mexicanos poseen baja toxicidad y ejercen una actividad antiviral contra el virus de Sarampión cepa

Edmoston, actuando a diferentes niveles del ciclo de replicación viral (adsorción, entrada viral y mecanismo virucida) y con una actividad sinérgica al combinarse a bajas concentraciones entre ellos mismos o con la ribavirina.

Las algas mexicanas poseen compuestos antivirales contra el virus de Sarampión que pueden ser utilizados en el control de brotes y como auxiliares en la erradicación de esta enfermedad.

## **PERSPECTIVAS**

El presente trabajo sugiere que los polisacáridos sulfatados y polifenoles de algas mexicanas pueden ser potenciales antivirales de otros virus envueltos de importancia médica y veterinaria, por lo que evaluar el efecto inhibitorio, mecanismo de acción y efecto combinado de estos productos en otros virus envueltos podría ser de gran importancia.

Evaluar diversas actividades biológicas propuestas para estos productos, como la actividad inmunomoduladora y la actividad antioxidante.

Evaluar en los compuestos antivirales los parámetros establecidos por la FDA para la aprobación de fármacos, como la hepatotoxicidad, regulación de genes CYP y enzimas metabolizadoras de drogas, entre otros parámetros, con el objetivo de evidenciar la inocuidad de los compuestos.

Realizar ensayos in vivo utilizando un modelo animal, para evaluar la toxicidad y efectividad de los compuestos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adhikari U, Mateu CG, Chattopadhyay K, Pujol CA, Damonte EB, Ray B. 2006. Structure and antiviral activity of sulfated fucans from *Stoechospermum marginatum*. *Phytochemistry* 67: 2474–2482.
- Aguilar-Briseño JA, Cruz-Suarez LE, Sassi JF, Ricque-Marie D, Zapata-Benavides P, Mendoza-Gamboa E, Rodríguez-Padilla C, Trejo-Avila LM. 2015. Sulphated polysaccharides from *Ulva clathrata* and *Cladosiphon okamuranus* seaweeds both inhibit viral attachment/entry and cell-cell fusion, in NDV infection. *Marine Drugs* 13: 697–712.
- Ahmadi A, Zorofchian Moghadamtousi S, Abubakar S, Zandi K. 2015. Antiviral potential of algae polysaccharides isolated from marine sources: A review. *BioMed Research International* 2015: .
- Ajila C, Brar S, Verma M, Tyagi R, Godbout S, Valéro J. 2010. Extraction and Analysis of Polyphenols : Recent trends Extraction and Analysis of Polyphenols : Recent trends. *Critical Reviews in Biotechnology* 31: 227–249.
- Akamatsu E, Shimanaga M, Kamei Y. 2003. Isolation of an anti-influenza virus substance, MC26 from a marine brown alga, *Sargassum piluliferum* and its antiviral activity against influenza virus. *Coast. Bioenviron.* 1: 29–34.
- Ale MT, Mikkelsen JD, Meyer AS. 2012. Designed optimization of a single-step extraction of fucose-containing sulfated polysaccharides from *Sargassum* sp. *Journal of Applied Phycology* 24: 715–723.
- Antonelli G, Turriziani O. 2012. Antiviral therapy: Old and current issues. *International Journal of Antimicrobial Agents* 40: 95–102.
- Arvizu DL, Rodríguez YE, Hernández G, Murillo JL. 2007. Chemical constituents of *Eisenia arborea* Areschoug from Baja California Sur, México. *Investigaciones marinas* 35: 63–69.
- Barbosa JP, Pereira RC, Abrantes JL, Santos CCC dos, Rebello MA, Frugulhetti IC de PP, Teixeira VL. 2004. In vitro Antiviral Diterpenes from the Brazilian Brown Alga *Dictyota paffii*. *Planta Medica* 70: 856–860.
- Barrett T. 1999. Morbillivirus infections , with special emphasis on morbilliviruses of carnivores. *Veterinary Microbiology* 69: 3–13.
- Belardo G, Cenciarelli O, La Frazia S, Rossignol JF, Santoro MG. 2015. Synergistic Effect of Nitazoxanide with Neuraminidase Inhibitors against Influenza A Viruses\ In Vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59: 1061–1069.

- Bellini WJ, Englund G, Rozenblatt S, Arnheiter H, Chris D. 1985. Measles Virus P Gene Codes for Two Proteins. *Journal of Virology* 53: 908–919.
- Berteau O, Mulloy B. 2003. Sulfated fucans , fresh perspectives : structures , functions , and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. *Glycobiology* 13: 29–40.
- Besednova NN, Makarenkova ID, Zvyagintseva TN, Imbs TI, Somova LM, Zaporozhets TS. 2016. Antiviral Activity and Pathogenetic Targets for Seaweed Sulfated Polysaccharides in Herpesvirus Infections. *Biochemistry (Moscow)* 10: 31–42.
- Bouhlal R, Haslin C, Chermann J-C, Collic-Jouault S, Siquin C, Simon G, Cerantola S, Riadi H, Bourgougnon N. 2011. Antiviral Activities of Sulfated Polysaccharides Isolated from *Sphaerococcus coronopifolius* (Rhodophyta, Gigartinales) and *Boergeseniella thuyoides* (Rhodophyta, Ceramiales) Rhimou. *Marine Drugs* 9: 1187–1209.
- Buck CB, Thompson CD, Roberts JN, Müller M, Lowy DR, Schiller JT. 2006. Carrageenan is a potent inhibitor of papillomavirus infection. *PLoS Pathogens* 2: 0671–0680.
- Campo VL, Kawano DF, Silva DB da, Carvalho I. 2009. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis - A review. *Carbohydrate Polymers* 77: 167–180.
- Carlucci MJ, Mateu CG, Artuso MC, Scolaro LA. 2012. Polysaccharides from Red Algae: Genesis of a Renaissance. *The Complex World of Polysaccharides* p. 535–554.
- Carlucci MJ, Pujol CA, Ciancia M, Nosedá MD, Matulewicz MC, Damonte EB, Cerezo AS. 1997. Antiherpetic and anticoagulant properties of carrageenans from the red seaweed *Gigartina skottsbergii* and their cyclized derivatives: correlation between structure and biological activity. *International Journal of Biological Macromolecules* 20: 97–105.
- Cassolato JEF, Nosedá MD, Pujol CA, Pellizzari FM, Damonte EB, Duarte MER. 2008. Chemical structure and antiviral activity of the sulfated heterorhamnan isolated from the green seaweed *Gayralia oxysperma*. *Carbohydrate Research* 343: 3085–3095.
- CDC. 2017. <https://www.cdc.gov/measles/cases-outbreaks.html>. Revisado Abril 2017.
- Chevolot L, Foucault A, Chaubet F, Kervarec N. 1999. Further data on the structure of brown seaweed fucans : relationships with anticoagulant activity. *Carbohydrate Research* 319: 154–165.

- Chiu Y, Chan Y, Li T. 2012a. Inhibition of Japanese Encephalitis Virus Infection by the Sulfated Polysaccharide Extracts from *Ulva lactuca*. *Marine biotechnology* 14: 468–478.
- Chiu Y, Chan Y, Tsai L, Li T, Wu C. 2012b. Prevention of human enterovirus 71 infection by kappa carrageenan. *Antiviral Research* 95: 128–134.
- Chou TC. 2010. Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method. *Cancer Research* 70: 440–446.
- Clercq E De. 2016. Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years. 29: 695–747.
- Damonte EB, Matulewicz MC, Cerezo AS. 2004. Sulfated Seaweed Polysaccharides as Antiviral Agents Sulfated Seaweed Polysaccharides as Antiviral Agents. *Current Medicinal Chemistry* 11: 2399–2419.
- Dawes C. 2016. Macroalgae Systematics. *Seaweed in Health and Disease Prevention* p. 107.
- Dinesh S, Menon T, Hanna LE, Suresh V, Sathuvan M, Manikannan M. 2015. In vitro anti-HIV-1 activity of fucoidan from *Sargassum swartzii*. *International Journal of Biological Macromolecules* 6–11.
- Eccles R, Meier C, Jawad M, Weinmüllner R, Grassauer A, Prieschl-grassauer E. 2010. Efficacy and safety of an antiviral Iota-Carrageenan nasal spray : a randomized , study in volunteers with early symptoms of the common cold. *Respiratory Research* 11: 1–10.
- Elizondo-Gonzalez R, Cruz-Suarez LE, Ricque-Marie D, Mendoza-Gamboa E, Rodriguez-Padilla C, Trejo-Avila LM. 2012. In vitro characterization of the antiviral activity of fucoidan from *Cladosiphon okamuranus* against Newcastle Disease Virus. *Virology journal* 9: 307.
- Fabio Rindi , Anna Soler-Vila MDG. 2012. Taxonomy of Marine Macroalgae Used as Sources of Bioactive Compounds. *Marine Bioactive Compounds* p. 1–53.
- Furuse Y, Suzuki A, Oshitani H. 2010. Origin of measles virus : divergence from rinderpest virus between the 11 th and 12 th centuries. *Virology journal* 7: 2–5.
- Gamal AA El. 2010. Biological importance of marine algae. *Saudi Pharmaceutical Journal* 18: 1–25.
- Garg HS, Bhakuni S, Pramaaik N, Bose K. 1992. An antiviral sphingosine derivative from the green alga *Ulva Fasciata*. *Tetrahedron Letters* 33: 1641–1644.

- Gerber P, Dutcher JD, Adams E V., Sherman JH. 1958. Protective Effect of Seaweed Extracts for Chicken Embryos Infected with Influenza B or Mumps Virus. *Experimental Biology and Medicine* 99: 590–593.
- Grasdalen H, Larsen B, Smisrod O. 1981. <sup>13</sup>C-n.m.r. studies of monomeric composition and sequence in alginate. *Carbohydrate Research* 89: 179–191.
- Griffin DE, Oldstone MBA. 2009. Measles History and Basic Biology. *Current Topics in Microbiology and Immunology* p. 1–30.
- Harborne JB, Williams CA. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55: 481–504.
- Haslama E, Caib Y. 1994. Plant Polyphenols (Vegetable Tannins) : Gallic Acid Metabolism. *Natural Product Reports* 11: 41–66.
- Hayashi K, Lee JB, Nakano T, Hayashi T. 2013. Anti-influenza A virus characteristics of a fucoidan from sporophyll of *Undaria pinnatifida* in mice with normal and compromised immunity. *Microbes and Infection* 15: 302–309.
- Hayashi K, Nakano T, Hashimoto M, Kanekiyo K, Hayashi T. 2008. Defensive effects of a fucoidan from brown alga *Undaria pinnatifida* against herpes simplex virus infection. *International Immunopharmacology* 8: 109–116.
- Hidari KIPJ, Takahashi N, Arihara M, Nagaoka M, Morita K, Suzuki T. 2008. Structure and anti-dengue virus activity of sulfated polysaccharide from a marine alga. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 376: 91–95.
- Hines NL, Miller CL. 2012. Avian Paramyxovirus Serotype-1 : A Review of Disease Distribution , Clinical Symptoms , and Laboratory Diagnostics. *Veterinary Medicine International* 708216.
- Horzinek MC. 2011. Rinderpest: The second viral disease eradicated. *Veterinary Microbiology* 149: 295–297.
- Huang AS, Wagner RR. 1964. Penetration of Herpes Simplex Virus into Human Epidermoid Cells. *Experimental Biology and Medicine* 116: 863–868.
- Jha RK, Zi-rong X. 2004. Biomedical Compounds from Marine organisms. *Marine Drugs* 2: 123–146.
- Kang D, Fang Z, Naesens L, Clercq E De, Zhan P, Liu X. 2015. Synthesis and Preliminary Antiviral Activities of Piperidine-substituted Purines against HIV and Influenza A / H1N1 Infections. *Chemical Biology & Drug Design* 86: 568–577.

- King PJ, Ma G, Miao W, Jia Q, McDougall BR, Reinecke MG, Cornell C, Kuan J, Kim TR, Robinson WE. 1999. Structure - Activity Relationships : Analogues of the Dicafeoylquinic and Dicafeoyltartaric Acids as Potent Inhibitors of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Integrase and Replication †. *Journal of medicinal chemistry*. 11: 497–509.
- Koehn FE, Niel DN, Cross SS, Gunasekera SF. 1991. Halitunal, an unusual diterpene aldehyde from the marine alga *Halimeda tuna*. *Tetrahedron Letters* 32: 169–172.
- Koizumi Y, Iwami S. 2014. Mathematical modeling of multi-drugs therapy: a challenge for determining the optimal combinations of antiviral drugs. *Theoretical biology & medical modelling* 11: 41.
- Koshihara Y, Neichi T, Murota S, Lao A, Fujimoto Y, Tatsuno T. 1984. Caffeic acid is a selective inhibitor for leukotriene biosynthesis . *Biochimica et biophysica acta* 792: 1984.
- Kraan S. 2012. *Algal Polysaccharides , Novel Applications and Outlook*. .
- Lahaye M, Robic A. 2007. Structure and Functional Properties of Ulvan, a Polysaccharide from Green Seaweeds. *Biomacromolecules* 8: 24–30.
- Lamb RA, Paterson RG, Jardetzky TS. 2006. Paramyxovirus membrane fusion: Lessons from the F and HN atomic structures. *Virology* 344: 30–37.
- Lee J-B, Hayashi K, Maeda M, Hayashi T. 2004. Antiherpetic Activities of Sulfated Polysaccharides from Green Algae. *Planta Medica* 70: 2–6.
- Lee J, Hayashi K, Hayashil T. 1999. Antiviral Activities against HSV-1, HCMV, and HIV-1 of Rhamnan Sulfate from *Monostroma latissimum*. *Planta Medica* 65: 439–441.
- Lee J, Koizumi S, Hayashi K, Hayashi T. 2010. Structure of rhamnan sulfate from the green alga *Monostroma nitidum* and its anti-herpetic effect. *Carbohydrate Polymers* 81: 572–577.
- Leibbrandt A, Meier C, Ko M, Pflugfelder B, Graf P, Frank-gehrke B, Beer M, Fazekas T, Unger H, Prieschl-grassauer E, Grassauer A. 2010. Iota-Carrageenan Is a Potent Inhibitor of Influenza A Virus Infection. *PLoS ONE* 5: 1–11.
- Leskinen E, Alström-Rapaport C, Pamilo P. 2004. Phylogeographical structure , distribution and genetic variation of the green algae *Ulva intestinalis* and *U . compressa* (Chlorophyta) in the Baltic Sea area. *Molecular Ecology* 13: 2257–2265.
- Li A, Li S, Zhang Y, Xu X, Chen Y, Li H. 2014. Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols. *Nutrients* 6: 6020–6047.



- Li B, Lu F, Wei X, Zhao R. 2008. Fucoidan: Structure and Bioactivity. *Molecules* 13: 1671–1695.
- Li Y, Fu X, Duan D, Liu X, Xu J, Gao X. 2017. Extraction and Identification of Phlorotannins from the Brown Alga, *Sargassum fusiforme* (Harvey) Setchell. *Marine Drugs* 15: 1–15.
- Lin LT, Hsu WC, Lin CC. 2014. Antiviral Natural Products and Herbal Medicines. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* 4: 24–35.
- Lin M V, Sise ME, Pavlakis M, Amundsen BM, Chute D, Gabardi S, Chandraker A, Heher EC, Elias N, Riella L V. 2016. Efficacy and Safety of Direct Acting Antivirals in Kidney Transplant Recipients with Chronic Hepatitis C Virus Infection. *PLoS ONE* 11: 1–14.
- Lou Z, Sun Y, Rao Z. 2014. Current progress in antiviral strategies. *Trends in Pharmacological Sciences* 35: 86–102.
- Luo Z, Tian D, Zhou M, Xiao W, Zhang Y, Li M, Sui B, Wang W, Guan H, Chen H, Fu ZF, Zhao L. 2015.  $\lambda$ -Carrageenan P32 Is a Potent Inhibitor of Rabies Virus Infection. *Plos One* 10: e0140586.
- Mandal P, Mateu CG, Chattopadhyay K, Pujol CA, Damonte EB, Ray B. 2007. Structural features and antiviral activity of sulphated fucans from the brown seaweed *Cystoseira indica*. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* 18: 153–162.
- Marques MMM, Morais SM De, Silva ARA Da, Barroso ND, Pontes Filho TR, Araujo FMDC, Vieira IGP, Lima DM, Guedes MIF. 2015. Antiviral and Antioxidant Activities of Sulfated Galactomannans from Plants of Caatinga Biome. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2015: .
- Martinez JP, Sasse F, Diez J, Meyerhans A. 2015. Antiviral drug discovery : broad-spectrum drugs from nature. *Natural Product Reports* 32: 29–48.
- Mayer AMS, Diaz A, Pesce A, Criscuolo M, Groisman JF, de Lederkremer RM. 1987. Biological activity in *Macrocystis pyrifera* from Argentina: sodium alginate, fucoidan and laminaran. III. Antiviral activity. *Hydrobiologia* 151–152: 497–500.
- Mcdougall GJ, Kulkarni NN, Stewart D. 2009. Berry polyphenols inhibit pancreatic lipase activity in vitro. *Food Chemistry* 115: 193–199.
- Michalak I, Chojnacka K, Saeid A. 2017. Plant Growth Biostimulants, Dietary Feed Supplements and Cosmetics Formulated with Supercritical CO<sub>2</sub> Algal Extracts. *Marine Drugs* 22: 1–17.

- Mohamed SF, Agili FA. 2013. Antiviral sulphated polysaccharide from brown algae *Padina pavonia* characterization and structure elucidation. *International Journal of ChemTech Research* 5: 1469–1476.
- Morokutti-kurz M, König-schuster M, Koller C, Graf C, Graf P, Kirchoff N, Reutterer B, Seifert J. 2015. The Intranasal Application of Zanamivir and Carrageenan Is Synergistically Active against Influenza A Virus in the Murine Model. *PLoS ONE* 10: e0128794.
- Moss WJ, Griffin DE. 2006. Global measles elimination. *Nature reviews. Microbiology* 4: 900–908.
- Moss WJ, Griffin DE. 2012. Measles. *The Lancet* 379: 153–164.
- Mudnic I, Modun D, Rastija V, Vukovic J, Brizic I, Katalinic V, Bernard Kozina d, Marica Medic-Saric e MB a. 2010. Antioxidative and vasodilatory effects of phenolic acids in wine. *Food Chemistry* 119: 1205–1210.
- Necas J, Bartosikova L. 2013. Carrageenan : a review. 2013: 187–205.
- Ngo D, Kim S. 2013. Sulfated polysaccharides as bioactive agents from marine algae. *International Journal of Biological Macromolecules* 62: 70–75.
- O’Dor R, Miloslavich P, Yarincik K. 2010. Marine biodiversity and biogeography - Regional comparisons of global issues, an introduction. *PLoS ONE* 5: .
- Okuda T. 2006. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants q. *Phytochemistry* 66: 2012–2031.
- Ono N, Tatsuo H, Hidaka Y, Aoki T, Minagawa H, Yanagi Y. 2001. Measles Viruses on Throat Swabs from Measles Patients Use Signaling Lymphocytic Activation Molecule (CDw150) but Not CD46 as a Cellular Receptor. *Journal of Virology* 75: 4399–4401.
- Osuna-Ruiz I, Burgos-Hernández A, Velázquez C, Nieves-Soto M, Hurtado-Oliva MA. 2016. Antioxidant , antimutagenic and antiproliferative activities in selected seaweed species from Sinaloa, Mexico. *Pharmaceutical Biology* 54: 2196–2210.
- Pacheco-Ruiz S, Zertuche-Gonzalez JA, Chee-Barragan A, Arroyo-Ortega E. 2002. Biomass and potential commercial utilization of. *Phycologia* 41: 199–201.
- Paradossi G, Cavalieri F, Chiessi E, Vergata RT. 2002. A Conformational Study on the Algal Polysaccharide Ulvan. *Macromolecules* 35: 6404–6411.
- Pereira HS, LeoFerreira LR, N M, VL T, DN C. 2004. Antiviral activity of diterpenes isolated from the Brazilian marine alga *Dictyota menstrualis* against human immunodeficiency virus type 1 ( HIV-1 ). *Antiviral Research* 64: 69–76.

- Plempner RK, Snyder JP. 2015. Measles control – Can measles virus inhibitors make a difference?. *Current opinion in investigational drugs* 10: 811–820.
- Ponce NMA, Pujol CA, Damonte EB. 2003. Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis* : extraction methods , antiviral activity and structural studies. *Carbohydrate Research* 338: 153–165.
- Priengprom T, Ekalaksananan T, Kongyingyoes B, Suebsasana S, Aromdee C, Pientong C. 2015. Synergistic effects of acyclovir and 3, 19- isopropylideneandrographolide on herpes simplex virus wild types and drug-resistant strains. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 15: 56.
- Pujol CA, Ray S, Ray B, Damonte EB. 2012. Antiviral activity against dengue virus of diverse classes of algal sulfated polysaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules* 51: 412–416.
- Queiroz KCS, Medeiros VP, Queiroz LS, Abreu LRD, Rocha HAO. 2008. Inhibition of reverse transcriptase activity of HIV by polysaccharides of brown algae. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 62: 303–307.
- Rebours C, Marinho-Soriano E, Zertuche-González JA, Hayashi L, Vázquez JA, Kradolfer P, Soriano G, Ugarte R, Abreu MH, Bay-Larsen I, Hovelsrud G, Rødven R, Robledo D. 2014. Seaweeds: An opportunity for wealth and sustainable livelihood for coastal communities. *Journal of Applied Phycology* 26: 1939–1951.
- Shalaby EA. 2011. Algae as promising organisms for environment and health. *Plant Signaling & Behavior* 6: 1338–1350.
- Shao Q, Guo Q, Xu W, Li Z, Zhao T. 2015. Specific Inhibitory Effect of  $\kappa$ -Carrageenan Polysaccharide on Swine Pandemic 2009 H1N1 Influenza Virus. *PLoS ONE* 1–16.
- Shirogane Y, Takeda M, Tahara M, Ikegame S, Nakamura T, Yanagi Y. 2010. Epithelial-Mesenchymal Transition Abolishes the Susceptibility of Polarized Epithelial Cell Lines to Measles Virus. *The Journal of Biological Chemistry* 285: 20882–20890.
- Sugawara I, Itoh W, Kimura S, Mori S, Shimada K. 1998. Further characterization of sulfated homopolysaccharides as anti-HIV agents. *Nature* 45: 996–998.
- Sugiura Y, Matsuda K, Okamoto T, Kakinuma M, Amano H. 2008. Anti-allergic effects of the brown alga *Eisenia arborea* on Brown Norway rats. *Fisheries Science* 74: 180–186.
- Suleria HA, Osborne S, Gobe G. 2015. Marine-based Nutraceuticals: An innovative Trend in the Food and Supplement Industries. *Maringá* 13: 6336–6351.

- Tako M, Yoza E, Tohma S. 2000. Chemical characterization of acetyl fucoidan and alginate from commercially cultured *Cladosiphon okamuranus*. *Botanica Marina* 43: 393–399.
- Talarico LB, Nosedá MD, Ducatti DRB, Duarte MER, Damonte EB. 2011. Differential inhibition of dengue virus infection in mammalian and mosquito cells by iota-carrageenan. *Journal of General Virology* 92: 1332–1342.
- Thomas NV, Kim SK. 2011. Potential pharmacological applications of polyphenolic derivatives from marine brown algae. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 32: 325–335.
- Thompson KD, Dragar C. 2004. Antiviral Activity of *Undaria pinnatifida* against Herpes Simplex Virus. *Phytotherapy Research* 555: 551–555.
- Thuy TTT, Ly BM, Van TTT, Van Quang N, Tu HC, Zheng Y, Seguin-Devaux C, Mi B, Ai U. 2015. Anti-HIV activity of fucoidans from three brown seaweed species. *Carbohydrate Polymers* 115: 122–128.
- Trejo-Avila LM, Morales-Martínez ME, Ricque-Marie D, Cruz-Suarez LE, Zapata-Benavides P, Morán-Santibañez K, Rodríguez-Padilla C. 2014. In vitro anti-canine distemper virus activity of fucoidan extracted from the brown alga *Cladosiphon okamuranus*. *VirusDisease* 25: 474–480.
- Valdez MC, Zaragoza ES, Belda DL, Marcos R, Ramirez RA. 2003. The giant kelp *Macrocystis pyrifera* (Linnaeus) C. Agardh is a member of the large. 73: 545–556.
- Vanharanta M, Voutilainen S, Lakka TA, Lee M Van Der, Adlercreutz H, Salonen JT. 1999. Risk of acute coronary events according to serum concentrations of enterolactone: a prospective population-based case-control study. *The Lancet* 354: 2112–2115.
- Vilanova E, Coutinho CC, Mourão PAS. 2009. Sulfated polysaccharides from marine sponges (Porifera): An ancestor cell-cell adhesion event based on the carbohydrate-carbohydrate interaction. *Glycobiology* 19: 860–867.
- Wang L, Wang X, Wu H, Liu R. 2014. Overview on biological activities and molecular characteristics of sulfated polysaccharides from marine green algae in recent years.
- Wang W, Wang SX, Guan HS. 2012. The antiviral activities and mechanisms of marine polysaccharides: An overview. *Marine Drugs* 10: 2795–2816.
- WHO. 2012. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs286/en/> Revisado Junio 2012.
- WHO. 2017. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs286/en/> Revisado Marzo 2017.

- Wijesekara I, Pangestuti R, Kim S. 2011. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydrate Polymers* 84: 14–21.
- Wivianne I, Araújo F De, Ariévil J, Rodrigues G, Oliveira EDS. 2012. Iota-carrageenans from *Solieria filiformis* (Rhodophyta) and their effects in the inflammation and coagulation. *Maringá* 34: 127–135.
- Xianliang X, Meiyu G, Huashi G, Zelin L. 2000. Study on the mechanism of inhibitory action of 911 on replication of HIV-1 in vitro. *Chinese Journal of Marine Drugs* 19: 15–18.
- Zertuche-González JA, Sánchez-Barredo M, Guzmán-Calderón JM, Altamirano-Gómez Z. 2013. *Eisenia arborea* J.E. Areschoug as abalone diet on an IMTA farm in Baja California, México. *Journal of Applied Phycology* 1–4.
- Zhuang C, Itoh H, Mizuno T. 1995. Antitumor Active Fucoidan from the Brown Seaweed, *Umitoranoo* (*Sargassum thunbergii*). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 59: 563–567.

## **RESUMEN BIOGRÁFICO**

Karla Selene Morán Santibáñez  
Candidato para el Grado de  
Doctor en Ciencias con Especialidad en Microbiología

Tesis: **EVALUACION DEL EFECTO ANTIVIRAL COMBINACIONAL Y MECANISMO DE ACCION DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE ALGAS MEXICANAS.**

**Campo de estudio:** Virología.

**Datos personales:** Nacida en Monclova, Coahuila el 14 de Septiembre de 1987.

**Educación:**

- Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León obteniendo el grado de Químico Bacteriólogo Parasitólogo 2005-2009.
- Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, obteniendo el grado de Maestro en Ciencias con Acentuación en Microbiología 2010-2012
- Egresada de Colegio de Bioética de Nuevo León A.C., obteniendo el grado de Maestría en Bioética 2012-2014.

**Experiencia Profesional:**

- Profesor por horas de la Universidad Autónoma de Nuevo León desde 2013.

**Distinciones:**

- Premio a la Mejor Tesis de Licenciatura, 2010, por la Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Premio Tercer Lugar por la presentación de trabajo, modalidad cartel, Octubre de 2012 en el 2° Congreso de Cuerpos Académicos de Ciencias de la Salud UANL
- Medalla “Juventud Regia 2013”, en el área de Ciencia y Tecnología por el Ayuntamiento de Nuevo León.
- Beca “Proyeta 100mil” por la Secretaría de Relaciones Exteriores

**Presentaciones en Congresos:**

- Presentación del trabajo en modalidad cartel, Junio 2010: “Detección de secuencias génicas *env* específicas del virus de tumor mamario murino en muestras de pacientes con cáncer de pulmón” en modalidad CARTEL, en el Foro de Investigación por el XXX aniversario de la UMAE, Hospital de especialidades No. 25.

- Presentación de trabajo, modalidad oral, Septiembre 2011 “Caracterización del virus de tumor mamario murino en la línea celular de adenocarcinoma pulmonar 51” en el 6to Simposium Internacional de Inmunoterapia en Cáncer y Enfermedades Infecciosas.
- Presentación de trabajo, modalidad cartel Septiembre 2011 “Caracterización del virus de tumor mamario murino en la línea celular de adenocarcinoma pulmonar primario INER-51” en el XXVI Congreso Nacional de Investigación Biomédica.
- Presentación de trabajo, modalidad cartel, Noviembre 2011 “Detección de secuencias génicas del virus de tumor mamario murino en la línea celular de adenocarcinoma pulmonar primario INER-primario INER-51” en el XXVI Congreso Nacional de Investigación Biomédica.
- Presentación de trabajo, modalidad cartel, Octubre de 2012 “Caracterización del virus de tumor mamario murino en la línea celular de adenocarcinoma pulmonar primario INER-51 y análisis de su expresión” en el 2º Congreso de Cuerpos Académicos de Ciencias de la Salud UANL
- Presentación de trabajo, modalidad oral, Octubre 2014, “Antiviral activity of sulfated polysaccharides against Newcastle disease virus” 4th World Congress on Virology. DOI: 10.4172/1948-5964.S1.020
- Presentación de trabajo, modalidad poster, Junio 2015 “Inhibición in vitro del virus de sarampión con polisacáridos sulfatados provenientes de algas marinas mexicanas” Foro de Investigación por el XXXV aniversario de la UMAE, Hospital de especialidades No. 25 Junio 2015.
- Presentación de trabajo, modalidad oral, Octubre 2015, “Efecto antiviral de polisacáridos sulfatado de algas contra el virus de sarampión” en el XXVIII Congreso Nacional de Investigación Biomédica.
- Presentación de trabajo, modalidad poster, Octubre 2016, “Synergistic effects of secondary metabolites from Mexican seaweeds against measles virus” 2nd Symposium on Molecular Aspects of Virology, IPN, Ciudad de México.

### **Artículos publicados:**

- Morán-Santibañez K, Cruz-Suárez LE, Ricque-Marie D, Robledo D, Freile- Pelegrin Y, Peña-Hernandez MA, Rodríguez-Padilla C, and Trejo-Avila LM. 2016. Synergistic effects of sulfated polysaccharides from Mexican seaweeds against measles virus. BioMed Research International. Article ID 8502123.
- Trejo-Avila, LM, Morales-Martínez ME, Ricque-Marie D, Cruz-Suarez LE, Zapata-Benavides P, Morán-Santibañez K, Rodríguez-Padilla C. 2014. In vitro anti-canine distemper virus activity of fucoidan extracted from the brown alga *Cladosiphon okamuranus* VirusDis. 25(4):474–480.
- Trejo- Avila LM, Zapata-Benavides P, Barrera-Rodríguez R, Badillo-Almaráz I, Saavedra-Alonso S, Zamora-Avila DE, Morán-Santibañez K, Garza-Sáenz JA, Tamez-Guerra R, Rodríguez-Padilla C. 2011. Mouse mammary tumor virus-like gene sequences are present in lung patient specimens. Virol J. 24;8:451.